



Atty. Docket No.: 18433/2042

PATENT

Op 1636

BW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of: Rance, et al.  
Serial No.: 09/963,803  
Filed: September 26, 2001  
Entitled: Chimeric Expression Promoters  
Originating from Commelina Yellow  
Mottle Virus and Cassava Vein Mosaic  
Virus

Examiner: Sullivan, D.M.  
Group Art Unit: 1636  
Conf. No.: 9170

**CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 C.F.R. § 1.8a**

I hereby certify that this correspondence (and any paper or fee referred to as being enclosed) is being deposited with the United States Post Office as First Class Mail on the date indicated below in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Kathleen M. Williams

Name of Person Mailing Paper

Kathleen M. Williams  
Signature of Person Mailing Paper

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT**

Dear Sir:

As required by 35 U.S.C. 119(b), Applicants submit herewith a certified copy of FR 99/039/25, from which the above-referenced patent application claims priority.

Respectfully submitted,

Date: 11/1/04

Kathleen M. Williams  
Name: Kathleen M. Williams  
Registration No.: 34,380  
Customer No.: 29933  
Palmer & Dodge LLP  
111 Huntington Avenue  
Boston, MA 02199-7613  
Tel: 617-239-0100

THIS PAGE BLANK (USPTO)



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 AOUT 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

# BREVET D'INVENTION

26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livreVI

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

0	RESERVE A L'INPI			
0-1	Date de remise des pièces	29/3/99		
0-2	N° d'enregistrement national	9903925		
0-3	Département de dépôt	99		
0-4	Date de dépôt	29 MARS 1999		
0-6	Titre de l'invention	PROMOTEURS CHIMIQUES D'EXPRESSION, CASSETTES D'EXPRESSION, VECTEURS, PLANTES ET SEMENCES TRANSGÉNIQUES LES CONTENANT, ET MÉTHODES DE LEUR OBTENTION.		
0-8	Etablissement du Rapport de Recherche	immédiat		
0-9	Votre référence dossier	R01MPrCYMV		
1	DEMANDEUR(s)			
1-1	Nom	MERISTEM THERAPEUTICS		
	Suivi par	Thurgood, Alexander		
	Adresse rue	8 rue des Frères Lumière		
	Adresse code postal et ville	63100, CLERMONT-FERRAND		
	Pays	France		
	Nationalité	France		
	Forme juridique	Société anonyme		
	N° SIREN	418 231 007		
	Code APE-NAF	731Z		
	N° de téléphone	+33(0)473986810		
	N° de télécopie	+33(0)473986819		
	Courrier électronique	athurgood@meristem-therapeutics.com		
4	Déclaration de PRIORITE ou REQUETE du bénéfice de la date de dépôt d'une demande antérieure	Etat	Date	N° de la demande
6	Documents et Fichiers joints	Fichier électronique	Pages	Détails
6-1	Description	descrev2.doc	53	
6-2	Revendications	descrev2.doc	9	
6-3	Dessins		4	6 fig., 3 ex.
6-4	Abrégé	descrev2.doc	1	
6-5	Figure d'abrégué		1	fig. 4; 2 ex.
6-6	Listage de séquences	descrev2.doc		
6-7	Rapport de recherche			
6-8	Chèque			1226806
7	Mode de paiement	Remise d'un chèque		
7-1	Numéro de chèque	1226806		

8	REDEVANCES	Devise	Taux	Montant à payer
	062 Dépôt	FRF	250.00	250.00
	063 Rapport de recherche (R.R.)	FRF	4 200.00	4 200.00
	068 Revendication à partir de la 11ème	FRF	115.00	5 750.00
	Total à acquitter	FRF		10 200.00
10	Signature			
10-1	Signé par		Thurgood, Alexander Head of Intellectual Property MERISTEM THERAPEUTICS	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1,1**

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		MPr CYMV
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		99 03925
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  PROMOTEURS CHIMERIQUES D'EXPRESSION, CASSETTES D'EXPRESSION, VECTEURS, PLANTES ET SEMENCES TRANSGENIQUES LES CONTENANT, ET MÉTHODES DE LEUR OBTENTION		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  MERISTEM THERAPEUTICS S.A. 8 RUE DES FRÈRES LUMIÈRE 63100 CLERMONT FERRAND		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		RANCE
Prénoms		IANN
Adresse	Rue	54 RUE PROUDHON
	Code postal et ville	63000 CLERMONT FERRAND
Société d'appartenance (facultatif)		MERISTEM THERAPEUTICS
Nom		GRUBER
Prénoms		VERONIQUE
Adresse	Rue	RESIDENCE SAINTE MADELEINE
	Code postal et ville	44C AVENUE JEAN JAURES 63400 CHAMALIERES
Société d'appartenance (facultatif)		MERISTEM THERAPEUTICS
Nom		THEISEN
Prénoms		MANFRED
Adresse	Rue	1 RUE DES ROSERAIES
	Code postal et ville	63400 CHAMALIERES
Société d'appartenance (facultatif)		MERISTEM THERAPEUTICS
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		27 avril 2000   ALEX THURGOOD Head of Intellectual Property

## **DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

PROMOTEURS CHIMERIQUES D'EXPRESSION, CASSETTES D'EXPRESSION,  
VECTEURS, PLANTES ET SEMENCES TRANSGÉNIQUES LES CONTENANT, ET  
MÉTHODES DE LEUR OBTENTION.

5 [DESCRIPTION]

La présente invention concerne des promoteurs chimériques d'expression, destinés notamment à une mise en oeuvre dans le domaine la biotechnologie végétale.

De manière générale, les promoteurs d'expression sont connus dans 10 le domaine de la biotechnologie et de la manipulation génétique. S'agissant plus particulièrement de la biotechnologie végétale, le taux d'expression d'un gène codant pour un polypeptide à produire dans une cellule hôte est souvent dépendant du promoteur utilisé. Le problème est que les différents promoteurs utilisés couramment 15 sont souvent limités à des applications ou des tissus particuliers, en raison de leur spécificité tissulaire ou puissance d'expression. On peut, par exemple, citer le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur comme un promoteur relativement fort, comparé par exemple au promoteur provenant du 20 gène *nos*, ces deux promoteurs étant plus particulièrement utilisés dans le domaine de la biotechnologie végétale. Il existe donc un besoin pour de nouveaux promoteurs permettant de pallier les inconvénients de la mise en oeuvre des promoteurs actuels. Une tentative de combler ce besoin a été rapportée dans la demande 25 de brevet PCT, publiée sous le numéro WO 97/48819, qui décrit des promoteurs dérivés du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV), tous comportant une partie de séquence d'acide nucléique présentant 18 nucléotides séquentiels dont l'homologie est d'au moins 80% comparée à une séquence de référence identifiée dans la 30 demande.

Les expressions utilisées dans la description et les revendications ont la signification suivante :

- "acide nucléique" signifie ADN ou ARN ;
- "séquence d'acide nucléique" signifie un oligomère ou polymère, 35 simple ou double brin, de bases nucléotidiques lues à partir de

l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', et comprend des plasmides autoréplicants, des gènes, des polymères d'ADN, ou d'ARN, infectieux ou non, et de l'ADN, ou l'ARN, fonctionnel ou non-fonctionnel. Dans la notation nucléotidique utilisée dans la

5 présente demande, sauf mention particulière, l'extrémité gauche d'une séquence nucléotidique simple brin est l'extrémité 5' ;

- "séquence d'acide nucléique dérivée" signifie que la séquence dérive directement ou indirectement de la séquence à laquelle il est fait référence, par exemple par substitution, délétion,

10 addition, mutation, fragmentation, et/ou synthèse d'un ou plusieurs nucléotides ;

- "promoteur" ou "séquence d'acide nucléique promotrice" signifie une région d'acide nucléique en amont du codon de démarrage de la traduction et qui est impliquée dans la reconnaissance et la

15 liaison de l'ARN polymérase et d'autres protéines pour la transcription ;

  - "promoteur végétal" est un promoteur capable d'initier la transcription dans des cellules végétales ;
  - "promoteur constitutif" est un promoteur capable d'exprimer des

20 séquences d'acides nucléiques liées de manière opérationnelle audit promoteur, dans tous ou pratiquement tous les tissus de l'organisme hôte pendant tout le développement dudit organisme ;

  - "promoteur tissulaire spécifique" est un promoteur capable d'exprimer de manière sélective, des séquences d'acides nucléiques

25 liées de manière opérationnelle audit promoteur, dans certains tissus spécifiques de l'organisme hôte ;

  - "liées de manière opérationnelle" signifie la liaison du promoteur, à la séquence d'acide nucléique, ou gène, à exprimer qui code pour une protéine à produire, de telle sorte que le

30 promoteur influence positivement la transcription de la séquence d'acide nucléique liée. On doit comprendre que la séquence du promoteur inclut également des séquences transcris entre le site de démarrage de la transcription et le codon de démarrage de la traduction ;

35 - "cassette d'expression" signifie des séquences nucléotidiques capables de diriger l'expression d'une séquence d'acide nucléique,

ou d'un gène, codant pour un polypeptide à produire dans un organisme hôte compatible avec de telles séquences. De telles cassettes incluent au moins un promoteur et un signal de terminaison de la transcription, et optionnellement d'autres

5 facteurs nécessaires ou utiles à l'expression ;

- "vecteur" signifie des systèmes d'expression, par exemple des projectiles enrobés d'ADN, des véhicules de transit à base d'acides nucléiques, des molécules d'acide nucléique adaptées pour livrer de l'acide nucléique, et de l'ADN circulaire autoréplicant

10 autonome, par exemple plasmides, cosmides, phagemides, etc. Si un micro-organisme ou une culture cellulaire recombinant est décrit comme hôte d'un "vecteur d'expression", ceci inclut de l'ADN circulaire extrachromosomique (tel que par exemple de l'ADN mitochondrial ou chloroplastique), de l'ADN ayant été intégré

15 au(x) chromosome(s) hôte(s), le vecteur pouvant être soit répliqué de manière stable par les cellules pendant la mitose en tant que structure autonome, intégré au génome de l'hôte, soit maintenu dans le noyau ou le cytoplasme de l'hôte ;

- "plasmide" signifie une molécule d'ADN circulaire autonome

20 capable de réplication dans une cellule, et comprend à la fois les plasmides dits "d'expression" et les plasmides dits "de non-expression". Si un micro-organisme ou culture cellulaire recombinante est décrit comme hôte d'un plasmide "d'expression", ceci comprend à la fois des molécules d'ADN circulaires

25 extrachromosomiques et de l'ADN ayant été intégré au(x) chromosome(s) hôte(s). Si le plasmide est maintenu par une cellule hôte, le plasmide est soit répliqué de manière stable par les cellules pendant la mitose en tant que structure autonome, soit intégré au génome de l'hôte ;

30 - "séquence hétérologue" ou "séquence d'acide nucléique hétérologue" signifie une séquence provenant d'une source, ou d'une espèce, étrangère à son environnement, ou si elle provient du même environnement, a été modifiée par rapport à sa forme originale. La modification de la séquence d'acide nucléique peut

35 avoir lieu par exemple par traitement de l'acide nucléique avec une enzyme de restriction pour générer un fragment d'acide

nucléique capable d'être lié de manière opérationnelle à un promoteur. La modification peut également avoir lieu par le biais de techniques comme la mutagenèse dirigée ;

- "boîte" signifie une séquence d'acide nucléique à laquelle une fonction régulatrice est imputée ;

- "like" signifie que la boîte et/ou la séquence d'acide nucléique à laquelle ce terme est associé, comporte une certaine identité de séquence ou un consensus avec une boîte et/ou une séquence d'acide nucléique connue dite de référence, de préférence une identité de séquence d'au moins 50%, de manière plus préférée une identité de séquence d'au moins 75%, et plus particulièrement une identité de séquence d'au moins 90% avec la séquence de référence. Le pourcentage d'identité de séquence est calculée sur la base d'une fenêtre de comparaison d'au moins 6 bases nucléotidiques. La détermination d'une fenêtre de comparaison peut être effectuée en utilisant des algorithmes d'alignement de séquences pour déterminer une homologie avec une séquence de référence, par exemple l'algorithme d'homologie locale, l'algorithme d'alignement d'homologie, et l'algorithme de recherche de similitude, ces algorithmes existant également sous forme informatique, connus sous les noms GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA. Le pourcentage d'identité de séquence est obtenue en comparant la séquence de référence avec la boîte et/ou la séquence d'acide nucléique ;

- "située" signifie la position sur une séquence d'acide nucléique d'un élément identifié, tel qu'une "boîte", un site de restriction, ou un codon ayant une fonction particulière. La position qui est donnée par un chiffre se réfère à la position du début de l'élément dans la séquence d'acide nucléique, dans le sens de la lecture de cette dernière, c'est-à-dire dans le sens 5' -> 3' ;

- "plante transgénique" signifie une plante ayant été obtenue par des techniques de manipulation génétique, et couvre les plantes entières obtenues, leur progéniture, ainsi que les organes végétaux, par exemple les racines, les tiges et les feuilles, obtenus par ces techniques. Les plantes transgéniques selon la présente invention peuvent avoir différents niveau de ploidie, et

peuvent notamment être polyptloïde, diploïde, et haploïde ;

- "propagule" signifie un amas ou une association de cellules végétales, structuré(e) ou non, permettant la régénération d'une plante entière, par exemples des explants, des cals, des tiges, 5 des feuilles, des racines, des boutures, et même des semences.

La demanderesse de la présente invention a pris une approche différente de celle du déposant de la demande PCT discutée préalablement. En effet, la demanderesse de la présente invention a réussi, et ce de manière surprenante, à produire des promoteurs 10 chimériques permettant de satisfaire au besoin décrit précédemment, et notamment permettant d'augmenter le taux d'expression d'un gène ou d'une séquence d'acide nucléique, codant pour un polypeptide à produire, dans une cellule hôte, et notamment une cellule végétale, par rapport aux promoteurs

15 existants les plus couramment utilisés. Par ailleurs, la demanderesse a réussi en même temps à produire une gamme de promoteurs de manière à pouvoir choisir celui qu'il convient d'utiliser selon l'application envisagée et l'environnement de sa mise en oeuvre, et ainsi de pouvoir contrôler en quelque sorte le 20 taux d'expression d'un gène à exprimer codant pour un polypeptide à produire.

Par conséquent, un objet de la présente invention est un promoteur chimérique d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un premier promoteur végétal comportant une 25 région promotrice de l'expression vasculaire végétal, ladite région promotrice vasculaire végétale étant remplacée par une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un deuxième promoteur végétal et comportant une région promotrice de l'expression dans des tissus verts végétaux.

30 De préférence, le premier promoteur végétal provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV) et le deuxième promoteur végétal provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV). De manière plus préférée, les séquences d'acide nucléique proviennent des régions intergéniques des premier et deuxième 35 promoteurs.

D'une manière particulièrement préférée, le promoteur chimérique

d'expression comprend au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID01 fusionnée à au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID02.

5 De manière plus particulièrement préférée, le promoteur chimérique de l'invention est choisi parmi le groupe consistant en les séquences d'acide nucléique identifiées sous les numéros SEQ.ID03, SEQ.ID04, SEQ.ID05, SEQ.ID06 et SEQ.ID07.

10 Selon un autre objet de la présente invention, la demanderesse a découvert qu'il était possible d'obtenir des promoteurs d'expression chimériques performants, en partant d'une base de promoteur d'origine virale, dont une partie consiste en un élément exogène promoteur de l'expression dans des tissus végétaux verts (GT). De préférence, l'élément exogène promoteur GT est également 15 d'origine virale. En outre, et selon un mode préféré de cet aspect de l'invention, le promoteur d'origine virale provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV). De manière préférée, l'élément exogène promoteur provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV). Plus préférentiellement encore, l'élément exogène 20 GT remplace l'élément endogène promoteur de l'expression dans les tissus vasculaires (VT) du promoteur d'origine virale.

Selon un mode d'exécution préféré des objets définis précédemment, les promoteurs chimériques comprennent en outre au moins une boîte "endosperme like".

25 Selon un autre mode préféré, les promoteurs comprennent en outre au moins une boîte "asl like" liée de manière opérationnelle en amont de l'élément promoteur dans les tissus végétaux verts GT.

Selon encore un autre mode préféré, les promoteurs comprennent en outre au moins une boîte "asl" liée de manière opérationnelle en

30 amont de l'élément promoteur dans les tissus verts végétaux GT.

Selon encore un autre mode préféré, les promoteurs comprennent en outre au moins une boîte "as2" liée de manière opérationnelle en amont de l'élément promoteur dans les tissus verts végétaux GT.

De manière préférentielle, le promoteur précédemment décrit est 35 choisi dans le groupe consistant en les séquences identifiées sous les numéros SEQ.ID01, SEQ.ID02, SEQ.ID03, SEQ.ID04, SEQ.ID05,

SEQ.ID06 et SEQ.ID07.

Selon un autre objet de la présente invention, on prévoit une cassette d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un premier promoteur végétal comportant une 5 région promotrice de l'expression vasculaire végétal, ladite région promotrice vasculaire végétale étant remplacée par une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un deuxième promoteur végétal et comportant une région promotrice de l'expression dans des tissus verts végétaux, les séquences étant liées de manière 10 opérationnelle à une séquence d'acide nucléique à exprimer codant pour un polypeptide à produire, elle même liée à une séquence d'acide nucléique de terminaison de transcription.

De préférence, et dans ce cas, ledit premier promoteur végétal provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV) et 15 ledit deuxième promoteur végétal provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV). Plus préférentiellement encore, la cassette comprend au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID01 fusionné à au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro 20 SEQ.ID02.

De manière plus préférée, la séquence d'acide nucléique du promoteur chimérique de la cassette d'expression est choisie parmi le groupe consistant en les séquences identifiées sous les numéros SEQ.ID03, SEQ.ID04, SEQ.ID05, SEQ.ID06 et SEQ.ID07.

25 Conformément à un autre objet de la présente invention, on prévoit une séquence d'acide nucléique promotrice isolée, choisie dans le groupe consistant en les séquences identifiées sous les numéros SEQ.ID03, SEQ.ID04, SEQ.ID05, SEQ.ID06 et SEQ.ID07.

Encore un autre objet de la présente invention concerne des motifs 30 désoxynucléotidiques pour l'obtention des promoteurs ou des séquences d'acide nucléiques promotrices identifiés précédemment. Ces motifs peuvent être :

- des motifs de construction, ou "sens", c'est-à-dire des séquences qui se lisent dans le sens de lecture de la séquence 35 final, soit à partir de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'; et/ou
  - des motifs de guidage, c'est-à-dire des séquences dont les

extrémités comportent des bases se chevauchant avec les extrémités des motifs de construction "sens".

Ainsi, et de manière préférée, le motif de construction "sens" correspond à au moins une séquence choisie dans le groupe

5 consistant en les séquences identifiées sous les numéros SEQ.ID08, SEQ.ID09, SEQ.ID10, SEQ.ID11, SEQ.ID13, et SEQ.ID14.

Par ailleurs, on préfère les motifs de guidage désoxynucléotidiques correspondant à au moins une séquence choisie dans le groupe consistant en les séquences identifiées sous les

10 numéros SEQ.ID15, SEQ.ID16, SEQ.ID17, et SEQ.ID18.

Un autre objet de la présente invention est un vecteur comprenant un promoteur, ou une séquence d'acide nucléique promotrice, capable d'initier la transcription d'une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide à produire, caractérisé en ce que le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice correspond à un promoteur chimérique d'expression ou à une séquence d'acide nucléique promotrice tels que définis précédemment.

De préférence, le vecteur est choisi dans le groupe consistant en 20 les vecteurs binaires identifiés sous les numéros pMRT1152, pMRT1171, et pMRT1172.

Enfin, un autre objet de la présente invention est un procédé d'obtention d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée tels que définis 25 précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- effectuer une réaction de ligation en chaîne, appelée LCR, produisant un ADN simple brin continu à partir d'au moins un motif désoxynucléotidique de construction choisi parmi le groupe

30 consistant en les désoxynucléotides "sens" S1, S2, S3, S4, S5, S6, et S7 identifiés sous les numéros SEQ.ID08, SEQ.ID09, SEQ.ID10, SEQ.ID11, SEQ.ID12, SEQ.ID13 et SEQ.ID14 respectivement, et au moins un motif de guidage désoxynucléotidique de construction de ladite séquence d'acide nucléique promotrice ou du

35 promoteur choisi parmi le groupe consistant en les désoxynucléotides de guidage G1, G2, G3 et G4 identifiés sous les

numéros SEQ.ID15, SEQ.ID16, SEQ.ID17 et SEQ.ID18 respectivement;

- effectuer une amplification PCR sur le simple brin obtenu dans l'étape précédente permettant d'obtenir un ADN double brin correspondant au promoteur chimérique d'expression ou à la

5 séquence d'acide nucléique promotrice;

- éventuellement isoler le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice.

Avantageusement, et de manière préférée, on phosphoryle les motifs désoxynucléotidiques de construction avant ligation. Plus

10 préférentiellement encore, la ligation s'effectue en présence d'au moins une ligase d'ADN dans un thermocycleur, selon les conditions suivantes :

- un cycle d'environ une minute à environ 94°C ;

- huit cycles identiques chacun composé de la succession

15 d'étapes suivantes :

- une minute à 65°C, une minute à 57°C, une minute à 52°C, une minute à 48°C, une minute à 43°C et dix minutes à 37°C.

Encore un autre but de la présente invention est une plante transgénique ayant intégré de manière stable dans son génome au 20 moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice tels que définis précédemment.

De préférence, la plante transgénique est choisie parmi les espèces dicotylédones, telles que la pomme de terre, le tabac, le coton, la laitue, la tomate, le melon, le concombre, le pois, le 25 colza, la betterave, ou le tournesol, ou les espèces monocotylédones, telles que le blé, l'orge, l'avoine, le riz, ou le maïs.

Encore un autre objet de la présente invention est une propagule d'une plante transgénique telle que définie précédemment, et de 30 préférence cette propagule est une semence.

Conformément à l'invention, un autre objet est une cellule contenant un promoteur ou une séquence d'acide nucléique promotrice tels que définis précédemment, et de préférence, cette cellule est une cellule végétale.

35 Selon un autre objet de l'invention, on prévoit une méthode d'expression d'une séquence d'acide nucléique, ou gène, codant

pour un polypeptide à produire, dans une cellule, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes consistant à :

- transformer la cellule avec un vecteur comprenant au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice 5 tels que définis précédemment ;

- faire une culture de la cellule dans des conditions permettant l'expression de la séquence d'acide nucléique, ou gène, codant pour le polypeptide. De préférence, la cellule est une cellule procaryote ou eucaryote, et de manière plus préférée est 10 choisie dans le groupe consistant en les cellules microbien, les cellules fongiques, les cellules d'insectes, les cellules animales, et les cellules végétales, et plus préférentiellement encore est une cellule végétale.

Selon encore un autre objet de la présente invention, on prévoit 15 une méthode d'obtention d'une plante transgénique ou d'une propagule caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes consistant à :

- transformer une cellule végétale avec un vecteur comprenant au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique 20 promotrice tels que définis précédemment ;

- sélectionner la cellule végétale ayant intégré le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice ;

- propager la cellule végétale transformée et sélectionnée, soit en culture, soit par régénération de plantes entières 25 chimériques ou transgéniques.

#### **DESCRIPTION DES FIGURES**

L'invention sera mieux comprise par la description détaillée des différents modes de réalisation donnés ci-après à titre d'exemples non limitatifs, et en se référant au dessin en annexe, dans 30 lequel :

- les Figures I, II et III représentent de manière schématique des structures de constructions comparatives de référence, permettant de comparer les promoteurs chimériques décrits dans la présente demande. Dans la Figure I, il s'agit 35 d'une construction contenant le gène rapporteur de la

$\beta$ -glucuronidase dépourvue de toute séquence promotrice, et servant donc de contrôle négatif.

- la Figure II représente de manière schématique une construction contenant le gène de la  $\beta$ -glucuronidase sous contrôle du promoteur CaMV double 35S, servant de contrôle de référence fort ;

- la Figure III représente une construction servant de référence interne lors des expériences d'expression transitoire, et est composée du gène rapporteur luciférase sous contrôle du promoteur CaMV 35S ;

- la Figure IV représente de manière schématique la structure de quelques exemples de promoteurs chimériques réalisés selon la présente invention. Les promoteurs chimériques MPr1116 et MPr1117 ont été obtenus par la technique de 1b-PCR. MPr1146 et MPr1147 ont été obtenus en clonant les éléments activateurs as1 et as2 du CaMV au niveau du site DraIII. Le promoteur MPr1154 a été obtenu en délétant les deux séquences "as-1 like" de CoYMV présentes en 5' de MPr1147. L'ensemble de ces promoteurs a été cloné au niveau des sites PstI et BamHI dans le vecteur pMRT1144 afin d'obtenir une fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur *uidA* ;

- la Figure V représente des colorations histochimiques de feuilles de tabac transformées avec les différents promoteurs de l'invention. Les feuilles de tabac ont été transformées par biolistique à l'aide du canon « PDS1000/He » (BIORAD) selon les caractéristiques suivantes : disques de rupture tarés à 900 psi, 2  $\mu$ g d'ADN bombardés en deux tirs successifs, projectiles constitués par des billes d'or de l'ordre de 1  $\mu$ m de diamètre, matériel végétal positionné à 6 puis 9 cm sous le macrocarrier. Après bombardement, les feuilles ont été incubées à l'obscurité en chambre de culture pendant 48 heures pour permettre l'expression du gène rapporteur. Les feuilles ont ensuite été incubées dans du tampon phosphate 0,1 M contenant 2 mg/ml de X-Glu à 37°C pendant 24 à 48 heures, puis dépigmentées dans un bain d'éthanol à 70%.

- la Figure VI représente un graphique comparant l'activité promotrice relative des différentes constructions après expression transitoire dans des feuilles de tabac. Trois jours après

bombardement les feuilles sont broyées puis l'extrait brut clarifié par centrifugation. L'activité  $\beta$ -glucuronidase et l'activité luciférase sont mesurées par fluorimétrie sur un aliquote de l'extrait brut, puis le rapport activité GUS / activité LUC est déterminé. Les histogrammes correspondent à la moyenne des rapports pour une même construction +/- Erreur Standard à la Moyenne (SEM).

Dans ces différentes figures, certains termes et expressions ont les significations suivantes :

- 10 - uidA = la séquence codant pour la  $\beta$ -glucuronidase ;
- IV2 = l'intron du gène de la patatine ;
- nos term = le terminateur du gène de la Nopaline Synthase ;
- 35S term = le terminateur de l'ARN 35S du CaMV ;
- CaMV = virus de la mosaïque du chou fleur ;
- 15 - as-1 = séquence activatrice 1 du promoteur 35S du CaMV ;
- as-2 = séquence activatrice 2 du promoteur 35S du CaMV ;
- B = le site de restriction de l'endonucléase BamHI ;
- E = le site de restriction de l'endonucléase EcoRI ;
- H = le site de restriction de l'endonucléase HindIII ;
- 20 - P = le site de restriction de l'endonucléase PstI ;
- Sp = le site de restriction de l'endonucléase SphI.
- D = le site de restriction de l'endonucléase DraIII ;
- N = le site de restriction de l'endonucléase NdeI ;
- S = le site de restriction de l'endonucléase SpeI ;
- 25 - CoYMV = virus de la mosaïque jaune de Comellina;
- CsVMV = virus de la mosaïque de cassava ;
- TATA = boîte TATA ;
- +1 = site d'initiation de la transcription ;
- "like" signifie que la séquence n'est pas 100% homologue à la
- 30 séquence de référence, comme précédemment défini.

#### EXEMPLES

##### Exemple 1

##### Constructions comparatives (témoins)

- 35 Pour permettre la comparaison des promoteurs chimériques décrits

dans ce brevet, le gène *uidA* codant la  $\beta$ -glucuronidase (Jefferson et al., 1986) contenant la séquence de l'intron IV2 du gène *ST-LS1* de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt et al., 1990) (*uidA-IV2*) a été placé sous contrôle de l'un des promoteurs et du

5 terminateur du gène de la nopaline synthase (*nos* term) d'*Agrobacterium tumefaciens* dans le plasmide pGEM3Z commercialisé par Promega Corp. (Madison, USA).

### 1.1. Construction du témoin négatif pMRT1144.

Pour faciliter les clonages, un plasmide dérivé de pGEM3Z, ne 10 possédant que les séquences "*uidA-IV2/nos* term" et dépourvu de toute séquence promotrice a été construit. Ce plasmide est appelé pMRT1144 et sert de témoin négatif (Fig. I).

Pour insérer la séquence *uidA/nos* term dans pGEM3Z, la séquence *uidA* sous contrôle du promoteur entier du gène de la plastocyanine

15 de pois et du terminateur de la nopaline synthase, a été isolée à partir de 5  $\mu$ g du plasmide pGA492-PpetE. Celui-ci a été obtenu en clonant, dans le plasmide pGA492-Pem2-*uidA*, le promoteur *petE* du gène plastocyanine de pois du plasmide pKhn2 (Pwee et Gray, 1993) à la place du promoteur *em2* (Gaubier et al., 1993), provenant du

20 plasmide pBI221-Pem2. Le plasmide pBI221-Pem2 a été digéré par 20 unités de chacune des enzymes HindIII et EcoRI pendant 1 h à 37°C.

Puis, la cassette d'expression "Pem2/*uidA/nos* term" a été séparée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélue, précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 25 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min, centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70%, séché, resuspendu dans l'eau et inséré aux sites HindIII et EcoRI du plasmide pGA492 (An, 1986) digéré par ces deux enzymes pendant 1 h à 37°C, précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8

30 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min, centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70%, séché puis resuspendu dans l'eau. La ligation a été effectuée en présence de 1,0  $\mu$ l du tampon ADN ligase T4 10X (Amersham) et 2,5 unités d'ADN ligase T4 (Amersham) à 14°C pendant 16 h. Des

bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes ont été transformées (Hannahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu Luria-Bertani (LB, bactotryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l, Agar 5 g/l) supplémenté en tétracycline (12 mg/l), a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1983) et analysé par digestions enzymatiques.

A partir du plasmide pGA492-Pem2-uidA obtenu, le promoteur Pem2 a été déléte par double digestion par HindIII et XbaI. Le fragment 10 plasmidique a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélue, précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min, centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70%, séché, soumis à l'action du fragment de Klenow de 15 l'ADN polymérase I (New England Biolabs) pendant 30 min à 37°C selon les recommandations du fabricant. Ensuite, il a été déprotéinisé par extraction avec un volume de phénol, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme : alcool isoamylique 20 (24:1 v/v), précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min, puis centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70 %, séché, resuspendu dans l'eau. Puis, il a été déphosphorylé pendant 1 h à 37°C à l'aide de 10 unités de 25 phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant, déprotéinisé par extraction avec un volume de phénol, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24:1 v/v), précipité 30 en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min puis centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70 %, séché puis resuspendu dans l'eau. Le plasmide résultant a été appelé pGA492 $\Delta$ Pem2. 35 En parallèle, le promoteur petE (818 pb) qui correspond au

promoteur du gène de la plastocyanine de pois, a été obtenu à partir du plasmide pKHN2 par digestion par NcoI pendant 1 h à 37°C. Le fragment promoteur de 828 pb a été isolé sur gel d'agarose 0,8 %, électroélue, précipité en présence de 1/10 volume 5 d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min, centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70 %, séché, resuspendu dans l'eau, puis soumis à l'action de 5 unités de nucléase Mung Bean (New England Biolabs) pendant 30 min à 30°C selon les recommandations du fabricant, 10 déprotéinisé par extraction avec un volume de phénol, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24:1 v/v), précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C 15 pendant 30 min puis centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70 %, séché puis resuspendu dans l'eau. Ce fragment promoteur a été inséré dans le plasmide pGA492ΔPem2, décrit ci-dessus, en présence de 1,0 µl du tampon ADN ligase T4 10X (Amersham) et de 2,5 unités d'ADN ligase T4 (Amersham) à 14°C 20 pendant 16 h. Des bactéries *Escherichia coli* DH5α, rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en tétracycline (12 mg/l), a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestions enzymatiques. Le plasmide 25 résultant a été appelé pGA492-petE prom.  
Pour isoler la cassette d'expression "petE prom / uidA / nos term", 5 µg du plasmide pGA492-petE prom ont été digérés par PstI (site situé en 5' du promoteur du gène de la plastocyanine) et EcoRI (site localisé en 3' de la séquence terminatrice) pendant 1 30 h à 37°C, soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, et purifié sur colonne d'affinité Qiaquick (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Par ailleurs, 500 ng de plasmide pGEM3Z ont été digérés simultanément pendant 1 h à 37°C par EcoRI et PstI (sites de restriction présents dans le 35 site de clonage multiple ou polylinker), soumis à l'électrophorèse

sur gel d'agarose 0,8%, puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick.

La ligation a été réalisé avec 50 ng de vecteur pGEM3Z-PstI/EcoRI et 50 ng de la cassette d'expression *petE* prom / *uidA* / *nos* term 5 pendant 1 nuit à 18°C dans un milieu réactionnel de 12 µl en présence de 1,2 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et de 400 unités d'ADN ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par le mélange réactionnel de 10 ligation. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et a été analysé par digestions enzymatiques. Le plasmide obtenu a été appelé pGEM3Z-*petE* prom. Afin d'insérer l'intron IV2 de 192 pb du gène de la patatine de 15 pomme de terre dans la séquence codante *uidA*, une portion interne de ce gène (fragment SnaBI / BstBI de 710 pb dans pGEM3Z-*petE* prom) a été excisé puis remplacé par la séquence équivalente contenant l'intron IV2 (fragment SnaBI / BstBI de 902 pb). Pour ce faire, le plasmide pGEM3Z-*petE* prom a été digéré pendant 1 h à 20 37°C par SnaBI (site de restriction situé à la position +383 pb en aval du codon initiateur ATG du gène *uidA*) puis pendant 1 h à 65°C par BstBI (site localisé à la position +1093 pb). Le plasmide ainsi délégué du fragment de 710 pb a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, puis purifié sur colonne d'affinité 25 Qiaquick. Le fragment BstBI/SnaBI de 902 pb correspondant à la séquence de l'intron IV2 suivie de la séquence de *uidA* s'étendant de la position 383 à 1093 pb, a été isolé et purifié à partir du plasmide pSCV1.2-GI. Celui ci dérive du plasmide pSCV1.2 qui dérive lui-même du plasmide pSCV1 construit par G.A. Edwards en 30 1990 selon les méthodes usuelles de clonage. Le plasmide binaire pSCV1.2 a été obtenu par clonage du fragment HindIII portant la cassette d'expression "35S prom / *nptII* / *nos* term" (Fromm et al., 1986) au site HindIII de pSCV1. La cassette d'expression "35S prom / GUS-IV2 / 35S term" a été obtenue en digérant par HindIII 35 pendant 1 h à 37 °C le plasmide p35S GUS décrit par Vancanneyt

et al. (1990). Le fragment d'ADN correspondant à la cassette d'expression a été isolé sur gel d'agarose 0,8 %, électroélue puis précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min 5 puis, centrifugés à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans l'eau. Les extrémité 5' sortantes de ce fragment ont été rendues bouts-francs par l'action du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (New England Biolabs) pendant 30 min à 37°C selon les recommandations du fabricant, et le fragment a 10 été déprotéinisé par extraction avec un volume de phénol, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24:1 v/v), précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C 15 pendant 30 min puis, centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70 %, séché et enfin ligaturé avec 20 ng de plasmide pSCV1.2 digéré par SmaI pendant 1 h à 25°C, en présence de 1,0 µl du tampon ADN ligase T4 10X (Amersham) et 2,5 unités d'ADN ligase T4 (Amersham) à 14°C pendant 16 h. Des bactéries *Escherichia coli* 20 DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestions enzymatiques. 25 Cinq µg de plasmide pSCV1.2-GI ont été digérés pendant 1 h à 37°C par SnaBI (Site de restriction situé à la position +383 pb en aval du codon initiateur ATG du gène *uidA*) puis pendant 1 h à 65°C par BstBI (site localisé à la position +1285 pb). Le fragment de 902 pb a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,0%, puis 30 purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. La ligation a été réalisé avec 20 ng de vecteur pGEM3Z-*petE* prom BstBI/SnaBI et 80 ng du fragment de 902 pb BstBI/SnaBI, pendant 1 nuit à 18°C dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1,0 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités

d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et a été analysé par digestions enzymatiques. Le plasmide obtenu a été appelé pGEM3Z-petE prom / IV2.

Afin d'éliminer la séquence promotrice correspondant au fragment de 818 pb (petE) du plasmide pGEM3Z-petE prom / IV2, celui-ci a été digéré pendant 1 h à 37°C par BamHI puis, pendant 1 h à 37°C par PstI, isolé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. Les extrémités 5' sortantes de ce plasmide ont été rendues bouts-francs en utilisant l'ADN polymérase Pfu (Stratagene, La Jolla, USA) selon les recommandations du fournisseur. La ligation a été réalisé avec 10 ng de plasmide ainsi modifié pendant 1 nuit à 18°C dans un volume réactionnel de 12  $\mu$ l, en présence de 1,2  $\mu$ l du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées avec la moitié du milieu réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline, analysé par digestions enzymatiques, et vérifié par séquençage selon le procédé de Sanger et al. (1977). Le plasmide obtenu a été appelé pMRT1144 (Fig. I).

### 1.2. Construction du témoin positif MPr1092.

Afin de disposer d'une séquence promotrice de référence, le promoteur "double 35S" du virus de la mosaïque du choux fleur (CaMV D35S prom), a été placé en amont de la séquence uidA-IV2/nos term. Le plasmide pMRT1092 (Fig. I) résulte des étapes de clonage suivantes :

Dans un premier temps, l'intron IV2 de 192 pb du gène de la patatine de pomme de terre a été inséré dans la séquence codante

*uidA* à la position +383 pb comme décrit à la section 1.1. Une quantité de 1 µg de plasmide pBI221 (Clontech, CA, USA) a été digérée pendant 1h30 à 37°C par SnaBI puis, pendant 1h30 à 65°C par BstBI. Le plasmide déléte d'un fragment de 710 pb a été isolé 5 par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick.

Une quantité de 20 ng de vecteur pBI221 BstBI/SnaBI et 80 ng du fragment de 902 pb BstBI/SnaBI provenant de pSCV1.2-GI comme décrit précédemment, ont été ligaturés pendant 1 nuit à 18°C dans 10 un mélange réactionnel de 10 µl, en présence d'1 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et de 400 unités d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5α, rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN des clones 15 obtenus, sélectionnés sur milieu LB additionné d'ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et analysé par digestions enzymatiques. Le plasmide obtenu a été appelé pBI221/*uidA*-IV2.

Dans un deuxième temps, la séquence du promoteur 35S du CaMV 20 présente au niveau du plasmide pBI221/*uidA*-IV2 a été remplacée par la séquence "CaMV D35S". Pour ce faire, le plasmide pBI221/*uidA*-IV2 a été digéré pendant 10h30 à 37°C par 10 unités de HindIII, puis les extrémités cohésives ont été rendues bouts-francs par l'action du fragment de Klenow de l'ADN 25 polymérase I (New England Biolabs) pendant 30 min à 37°C selon les recommandations du fabricant. Après purification du produit de cette réaction sur colonne d'affinité Qiaquick, l'ADN a été digéré pendant une nuit à 37°C par 10 unités de BamHI. Le fragment plasmidique, correspondant au vecteur déléte du fragment promoteur 30 CaMV 35S de 828 pb, a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. CaMV D35S prom a été obtenu à partir du plasmide pJIT163Δ. Celui-ci dérive du plasmide pJIT163 qui dérive lui-même du plasmide pJIT160 (Guérineau et Mullineaux, 1993). Le plasmide 35 pJIT163 possède un codon ATG entre les sites HindIII et SalI du

polylinker. Pour supprimer cet ATG et obtenir le plasmide pJIT163 $\Delta$ , l'ADN plasmidique pJIT163 a été digéré par HindIII et SalI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélue, précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min, centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70%, séché, soumis à l'action du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (New England Biolabs) pendant 30 min à 37°C selon les recommandations du fabricant, déprotéinisé par extraction avec un volume de phénol, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24:1 v/v), précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min, puis centrifugé à 12000 g pendant 30 min, lavé à l'éthanol 70 %, séché et enfin ligaturé en présence de 1,0  $\mu$ l du tampon ADN ligase T4 10X (Amersham) et 2,5 unités d'ADN ligase T4 (Amersham) à 14°C pendant 16 h. Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestions enzymatiques.

Dix  $\mu$ g de plasmide pJIT163 $\Delta$  ont été digéré pendant 10h30 à 37°C par 10 unités de KpnI (site localisé en 5' du promoteur) puis les extrémités cohésives ont été rendues bouts francs par l'action de 6 unités de l'ADN polymérase T4 (New England Biolabs) pendant 30 min à 37°C selon les recommandations du fabricant. Après purification du produit de cette réaction sur colonne d'affinité Qiaquick, l'ADN a été digéré pendant une nuit à 37°C par 10 unités de BamHI. Le fragment d'ADN résultant de 761 pb, correspondant au promoteur D35S a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,0 %, puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. Le mélange réactionnel contenant 10 ng de vecteur plasmidique, 100 ng du fragment de 761 pb, 1,0  $\mu$ l du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités d'ADN ligase T4 (New England

Biolabs) a été soumis à ligation dans 10 ml pendant une nuit à 18°C. Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones obtenus, 5 sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et analysé par digestions enzymatiques. Le plasmide obtenu a été appelé pMRT1092 (Fig. II).

### 1.3. Description du plasmide de référence pCaMV35S1uc.

10 Le plasmide servant de référence interne lors de l'expression transitoire est pCaMV35S1uc (Torrent et al., 1997) qui contient la cassette d'expression du gène rapporteur luciférase (luc) sous contrôle du promoteur et du terminateur de l'ARN 35S du CaMV (Fig. III).

### 15 Exemple 2

#### Construction de promoteurs chimériques combinant des éléments des promoteurs du CsVMV et du CoYMV.

Le promoteur entier de la région inter génique du CoYMV correspond à une séquence de 1038 pb allant de la position -1026 pb à la 20 position + 12 pb (par rapport à l'extrémité 5' du transcrit CoYMV, séquence EMBL X52938, Medberry et al., 1992). Un fragment de 243 pb de ce promoteur entier (Medberry et Olszewski, 1993) a été retenu pour la construction de promoteurs chimériques (SEQ.ID01). Sur ce fragment de 243 pb, diverses séquences potentiellement 25 régulatrices ont été identifiées (du côté 5' au côté 3', Fig. IV):  
 - une boîte "as-1 like" de 16 pb présentant une certaine similitude vis à vis de l'élément activateur 1 (as-1) présent au niveau du promoteur CaMV 35S, s'étendant de la position - 226 à la position -210 pb;  
 30 - une séquence de 76 pb responsable de l'expression dans les tissus vasculaires (Medberry et al., 1992), s'étendant de la position - 161 à la position - 85 pb, et désignée VT dans la figure IV ;  
 - un élément GTAA spécifique de l'expression dans les tissus verts 35 situé à la position -76 pb;

- deux boîtes "endosperme like" présentant une certaine similitude vis à vis de boîtes responsables de l'expression spécifique dans l'endosperme des céréales, localisées aux positions -77 pb et -20 pb;
- 5 - une boîte TATA, à la position -32;
- le point +1 de transcription (position 1);
- une région 5' non traduite allant de la position +1 à la position 12 pb.

Le promoteur de la région inter génique du CsVMV correspond à une séquence de 515 pb allant de la position +7162 pb à la position +7677 pb (séquence EMBL U59751, Verdaguer et al., 1996). Sur ce fragment de 515 pb (SEQ.ID02), diverses séquences potentiellement régulatrices ont été identifiées (du côté 5' au côté 3', Fig. IV) :

- une séquence de 104 pb, rapportée comme responsable de la forte expression conférée par ce promoteur dans les tissus verts et s'étendant de la position -220 pb à la position -116 pb, désignée GT dans la figure IV;
- un élément de type "as-1 like" de 16 pb présentant une certaine similitude vis à vis de l'élément activateur 1 (as-1) présent au niveau du promoteur CaMV 35S, s'étendant de la position -219 à la position -203 pb;
- 6 éléments GTAA spécifique de l'expression dans les tissus verts situés aux positions -437, -216, -144, -130, +16 et +63 pb;
- 6 boîtes "endosperme like" présentant une certaine similitude vis à vis de boîtes responsable de l'expression spécifique dans l'endosperme des céréales, localisées aux positions -196, -145, -136, -130, -122, +14 et +31 pb;
- une boîte TATA, à la position -33;
- le point +1 d'initiation de la transcription (position +1);
- 30 - une région 5' non traduite allant de la position +1 à la position 71 pb.

### 2.1. Construction de MPr1116.

La séquence de 104 pb du CsVMV s'étendant de la position -221 pb à la position -116 pb (à partir du point +1 d'initiation de la transcription), porte 4 boîtes "endosperme like", trois éléments GTAA spécifiques d'expression dans les tissus verts, et un élément

de type as-1 et est responsable de l'expression dans les tissus vasculaires. La région de 76 pb du CoYMV (s'étendant de la position -160 pb à la position -84 pb, SEQ.ID01), est responsable de l'expression dans les tissus vasculaires.

5 Le promoteur MPr1116 (Fig. IV) a été créé en fusionnant la séquence de 104 pb du promoteur de la région inter génique du génome du CsVMV (SEQ.ID02) dans la séquence du CoYMV déletée de la région de 76 pb, par la technique de 1b-PCR.

Cette technique combine une réaction de ligation en chaîne,

10 appelée LCR (Barany, 1991) produisant un ADN simple brin continu à l'aide d'oligodésoxynucléotides "sens", avec une réaction de PCR conduisant à l'obtention de l'ADN double brin.

L'ADN simple brin continu a été formé à l'aide des oligodésoxynucléotides "sens" suivants :

15 - S1 = 5' CATGCTGCAGACTAGTATCCGCCGTCAATGACATCATCACAGTACTGAGGA  
GATGAATAGCT 3' (SEQ.ID08)

- S2 = 5' AGCCATGACACTCTGTGCGAATATTGAAGACGTAAGCACTGACGACAACAATGA  
AAAGAA 3' (SEQ.ID09)

- S3 = 5' GAAGATAAGGTCGGTGATTGTGAAAGAGACATAGAGGACACATGTAAGGTGGA

20 AAATGTAAG 3' (SEQ.ID10)

- S4 = 5' GGCGGAAAGTAACCTTATGCATTGTAACTTGGTACCCGGTATGCCGGTCCCC  
AAGCTTAT 3' (SEQ.ID11)

- S5 = 5' TTCCTTATTAAAGCACTTGTAGCTTAGAAAACCAACACAACACCTAGAG  
GATCCCCG 3' (SEQ.ID12)

25 Cent pmol des oligodésoxynucléotides S1, S2 et S3 ont été phosphorylés en 5' par l'action de 15 unités de kinase (Amersham) en présence de 5 µl du tampon kinase 10X (Amersham) et 500 pmol d'ATP (Sigma), pendant 30 minutes à 37°C. Les oligodésoxynucléotides phosphorylés ont été purifiés par

30 extraction par un volume de phénol, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24:1 v/v), avant d'être précipités par de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 20 min puis

35 centrifugés à 16060 g pendant 30 min. Les oligodésoxynucléotides

précipités ont été lavés à l'éthanol 70%, séchés, puis remis en suspension dans de l'eau à une concentration de 10 pmol/μl.

Pour relier les oligodésoxynucléotides "sens", les oligodésoxynucléotides "guides" suivants ont été utilisés:

- 5 - G1 = 5' GACTCCTCTACTTATCGATCGGTACTGTGAGACA 3' (SEQ.ID15)
- G2 = 5' GCTGTTGTTACTTTCTTCTATTCCAGCCA 3' (SEQ.ID16)
- G3 = 5' ATTCCACCTTTACATTCCCGCCTTCATTG 3' (SEQ.ID17)
- G4 = 5' CAAGGGTTCGAAATAAGGAATAAAATTCTGGA 3' (SEQ.ID18)

Pour réaliser la réaction LCR, 10 pmol des oligodésoxynucléotides sens S1 phosphorylé, S2 phosphorylé, S3 phosphorylé, S4 phosphorylé, et S5 ont été ligaturés en présence de 10 pmol des oligodésoxynucléotides guides G1, G2, G3 et G4, 5 μl du tampon ADN ligase Taq 10X (New England Biolabs) et 40 unités d'ADN Ligase Taq (New England Biolabs). La réaction de ligation est réalisé dans le 15 thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Elle est constituée d'un cycle d'1 min à 94°C, et de 8 cycles identiques constitués chacun de la succession des étapes suivantes : 1 min à 65°C, 1 min à 57°C, 1 min à 52°C, 1 min à 48°C, 1 min à 43°C, et enfin 10 min à 37°C. Puis, le mélange 20 réactionnel de ligation a été purifié sur colonne Qiaquick selon les recommandations du fournisseur.

Enfin, l'amplification PCR de l'ADN simple brin obtenu a été réalisé dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 en présence de 100 pmol de chacune des amorces oligodésoxynucléotidiques 5' 25 CATGCTGCAGACTAGTATCC 3' et 5' CGGGGATCCTCTAGGTTGT 3', 50 nmol de chacun des dNTP, 10 μl de tampon ADN polymérase Vent 10X (New England Biolabs), et 2 unités d'ADN polymérase Vent (New England Biolabs). L'ADN a été dénaturé pendant 5 min à 94°C, soumis à 25 cycles constitués chacun de 30 sec de dénaturation à 95°C, de 30 sec d'hybridation à 55°C, et de 45 sec d'elongation à 72°C, puis 1'elongation à 72°C a été poursuivie pendant 5 min.

Les fragments d'ADN du milieu réactionnel ont été digérés pendant 45 min à 37°C par 20 unités de BamHI, puis pendant 1 h à 37°C par 20 unités de PstI, et enfin purifiés sur colonne Qiaquick. Ils ont 35 été insérés dans le plasmide pGEM3Z-petE prom (décris à la section

1.2.) digéré pendant 1 h à 37°C par BamHI puis pendant 1 h à 37°C par PstI, soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, purifié sur colonne d'affinité Qiaquick, déphosphorylé pendant 1 h à 37°C en présence de 12 µl de tampon 3 10X (New England Biolabs)

5 et de 5000 unités de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP, New England Biolabs), et enfin purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. Pour réaliser la ligation, 25 ng de du plasmide traité comme décrit ci-dessus ont été mis en présence de 100 ng des fragments d'ADN obtenus par PCR, en présence de 1,2 µl du tampon

10 ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs) pendant 1 nuit à 18°C. Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB

15 supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline, et analysé par digestions enzymatiques et par amplification génique à l'aide des oligodésoxynucléotides 5' CATGCTGCAGACTAGTATCC 3' choisi sur le promoteur et 5' TTGATTCACGGGTTGGG 3' choisi sur la séquence *uidA*. Deux plasmides

20 pMRT1116 et pMRT1117 résultants ont été séquencés. Le plasmide pMRT1116 contient le promoteur MPr1116 (SEQ.ID03), tandis que le plasmide pMRT1117 est porteur du promoteur MPr1117 (SEQ.ID04) qui diffère de MPr1116 par une duplication, en 5' du promoteur chimérique, de la boîte "as-1 like" et de son environnement

25 immédiat, totalisant 33 pb, ainsi que par la délétion de 3 pb en position -140, -25 et -24, et le remplacement d'une cytosine par une thymine en position -54 pb (Fig. IV).

## 2.2. Construction du promoteur MPr1146 :

Le promoteur MPr1146 (Fig. IV) a été obtenu en insérant la 30 séquence de 58 pb correspondant à une duplication du motif as-2 (Lam et Chua, 1989) et au motif as-1 (Lam et al., 1989) du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du choux fleur (CaMV), aux sites NheI et DraIII de MPr1116.

Pour ce faire, le plasmide pMRT1116 a été digéré pendant 1 h à 37°C par 25 unités de NheI, puis pendant 1 h à 37°C par 4 unités

de DraIII. Le plasmide ainsi digéré a été isolé sur gel d'agarose à 0,8 %, purifié sur colonne d'affinité Qiaquick et déphosphorylé pendant 1 h à 37°C en présence de 12 µl de tampon 3 10X (New England Biolabs) et de 5000 unités de phosphatase alcaline

5 d'intestin de veau (CIP, New England Biolabs), et enfin purifié à nouveau sur colonne d'affinité Qiaquick.

Le fragment SpeI/DraIII de 58 pb contenant les deux motifs as-2 et le motif as-1 a été obtenu à partir du plasmide pMRT1111.

Le plasmide pMRT1111, qui contient une séquence de 58 pb 10 correspondant à une duplication du motif as-2 (Lam et Chua, 1989) et au motif as-1 (Lam et al., 1989) du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du choux fleur (CaMV) en amont du promoteur minimal de la plastocyanine de pois modifié par l'ajout d'une boîte "G", a été obtenu par lb-PCR de la manière suivante. L'ADN 15 simple brin continu a été généré à l'aide des oligodésoxynucléotides sens suivants :

- S1 = 5' TTCCCTTCAAACACATACAAATTCACTAGAGAGAAACTCATTACTCTTGAGAAA CCTAGAGGATCCCCG 3'

20 - S2 = 5' CACAAAACCCAATCCACATCTTATCATCCATTCTATAAAAATCACCTCTGTG TGTCTCTCTTCGA 3'

- S5 = 5' CTGTGGCACATCTACATTCTAAATCTAAGCCACGTCGGAGGATAACATATTCT TCCACACATCTTAGCCA 3'

- S7 = 5' CATGCTGCAGACTAGTGATTGATGTGATATCAAGATTGATGTGATATCTCCACTG

25 ACGTAAGGGATGACGCATGCCACT 3' (SEQ.ID14)

Cent pmol des oligodésoxynucléotides S1, S2 et S5 ont été phosphorylés en 5' par 15 unités de kinase (Amersham) en présence de 5 µl du tampon kinase 10X (Amersham) et 500 pmol d'ATP (Sigma), pendant 30 min à 37°C. Les oligodésoxynucléotides phosphorylés ont 30 été purifiés par extraction par un volume de phénol, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme: alcool isoamylique (24:1 v/v), avant d'être précipités par de 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 35 20 min puis centrifugés à 16060 g pendant 30 min. Les

oligodésoxynucléotides précipités ont été lavés à l'éthanol 70%, séchés, puis remis en suspension dans de l'eau à une concentration de 10 pmol/μl.

Pour relier les oligodésoxynucléotides Sens, les

5 oligodésoxynucléotides guides suivants ont été utilisés :

- G1= 5' TGTGTTGAAGGGAATCGAAAGAGAGACACA 3' (SEQ.ID15)
- G2= 5' GATTGGGTTTGTTGTGGCTAAGATGTGTG 3' (SEQ.ID16)
- G4= 5' TGTAGATGTGCCACAGAGTGGCATGCGT 3' (SEQ.ID18)

Pour réaliser la réaction LCR, 10 pmol des oligodésoxynucléotides 10 sens S1 phosphorylé, S2 phosphorylé, S5 phosphorylé et S7 ont été ligaturés en présence de 10 pmol des oligodésoxynucléotides guides G1, G2 et G4, 5 μl du tampon ADN ligase Taq 10X (New England Biolabs) et 40 unités d'ADN ligase Taq (New England Biolabs). La réaction de ligation est réalisé dans le thermocycleur GeneAmp PCR

15 System 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Elle est constituée d'un cycle d'1 min à 94°C, et de 8 cycles identiques chacun composé de la succession des étapes suivantes : 1 min à 65°C, 1 min à 57°C, 1 min à 52°C, 1 min à 48°C, 1 min à 43°C, et enfin 10 min à 37°C.

Puis, le mélange réactionnel de ligation a été purifié sur colonne 20 Qiaquick selon les recommandations du fournisseur.

Enfin, l'amplification PCR de l'ADN simple brin obtenu a été réalisé dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 en présence de 100 pmol de chacune des amorces oligodéoxynucléotidiques 5' CATGCTGCAGACTAGTGGATT 3', et 5' CGGGGATCCTCTAGGTTCT 3', 50 nmol

25 de chacun des dNTP, 10 μl de tampon ADN polymérase Vent 10X (New England Biolabs), et 2 unités d'ADN polymérase Vent (New England Biolabs). L'ADN a été dénaturé pendant 5 min à 94°C, soumis à 25 cycles constitués chacun de 30 sec de dénaturation à 95°C, de 30 sec d'hybridation à 56°C, et d'1 min d'elongation à 72°C, puis

30 l'elongation à 72°C a été poursuivie pendant 5 min.

Les fragments d'ADN du milieu réactionnel ont été digérés pendant 45 min à 37°C par 20 unités de BamHI, puis pendant 1 h à 37°C par

20 unités de PstI, et enfin purifiés sur colonne Qiaquick. Ils ont été insérés dans le plasmide pGEM3Z-petE prom digéré pendant 1 h à

35 37°C par BamHI, puis pendant 1 h à 37°C par PstI, soumis à

l'électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, purifié sur colonne d'affinité Qiaquick, déphosphorylé pendant 1 h à 37°C en présence de 12 µl de tampon 3 10X (New England Biolabs) et de 5000 unités de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP, New England Biolabs), et enfin purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. Pour réaliser la ligation, 25 ng de plasmide traité comme décrit ci-dessus ont été mis en présence de 100 ng des fragments d'ADN obtenus par PCR, en présence de 1,2 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités d'ADN ligase T4 (New England Biolabs) pendant 1 nuit à 18°C. Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et a été analysé par digestions enzymatiques. La séquence promotrice MPr1111 de l'un de ces clones a été vérifiée par séquençage. Le fragment de 58 pb contenant les deux motifs as-2 et le motif as-1 a été obtenu en digérant 25 µg de plasmide pMRT1111 par 40 unités de SpeI pendant 1 h à 37°C, puis par 4 unités de DraIII pendant 1 h à 37°C. Le fragment a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose Nu-Sieve 3 % (FMC, Rockland, USA) et enfin purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. La ligation a été réalisé avec 30 ng de vecteur pMRT1116 NheI/DraIII déphosphorylé et 50 ng du fragment de 58 pb pendant 15 h à 18°C dans un milieu réactionnel de 20 µl en présence de 2,0 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 800 unités d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline, et analysé par digestions enzymatiques et par amplification génique à l'aide des oligodésoxynucléotides 5' CATGCTGCAGACTAGTATCC 3' choisi sur le promoteur et 5'

TTGATTCACGGGTTGGG 3' choisi sur la séquence *uidA*. La séquence promotrice MPr1146 (SEQ.ID05) de l'un de ces clones a été vérifié par séquençage.

**2.3. Construction du promoteur MPr1147 :**

5 Le promoteur MPr1147 (Fig. IV) a été obtenu en insérant une séquence de 44 pb du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du choux fleur (CaMV) contenant les motifs as-2 et as-1 (Lam, 1989 ; Lam et al., 1989) et des sites de restrictions adjacents aux sites NheI et DraIII de MPr1117 (SEQ.ID04).

10 Pour ce faire, le plasmide pMRT1117 a été digéré par 25 unités de NheI pendant 1 h à 37°C puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. Les extrémités générées ont été rendues bouts-francs par l'action de l'ADN polymérase Pfu (Stratagene, La Jolla, USA) selon les recommandations du fournisseur, puis le plasmide obtenu a été

15 digéré pendant 1 h à 37°C par 4 unités de DraIII. Le plasmide ainsi modifié a été isolé sur gel d'agarose à 0,8 %, purifié sur colonne d'affinité Qiaquick et déphosphorylé pendant 1 h à 37°C en présence de 12 µl de tampon 3 10X (New England Biolabs) et de 5000 unités de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP, New

20 England Biolabs), et enfin purifié à nouveau sur colonne d'affinité Qiaquick.

Le fragment PstI/DraIII de 55 pb contenant les 44 pb des motifs as-2 et as-1 du CaMV 35S a été obtenu à partir du plasmide pMRT1110. Le plasmide pMRT1110 qui contient une séquence de 44 pb

25 correspondant au motif as-2 (Lam et Chua, 1989) et au motif as-1 (Lam et al., 1989) du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du choux fleur (CaMV) en amont du promoteur minimal de la plastocyanine de pois modifié par l'ajout d'une boîte "G", a été obtenu par 1b-PCR de la manière suivante. L'ADN simple brin

30 continu a été formé à l'aide des oligodésoxynucléotides Sens suivants :

- S1 = 5' TTCCCTTCAAACACATACAAATTCACTAGAGAAGAAACTCATTACTCTTGAGAAA CCTAGAGGATCCCCG 3' (SEQ.ID08)
- S2 = 5' CACAAAAACCCAATCCACATCTTATCATCCATTCTATAAAAAATCACCTTCTGTG

35 TGTCTCTTTCGA 3' (SEQ.ID09)

- S5 = 5' CTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCTAAGCCACGTCGGAGGATAACATATTCT TCCACACATCTTAGCCA 3' (SEQ.ID12)

- S6 = 5'CATGCTGCAGACTAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG CATGCCACT 3' (SEQ.ID13)

5 Cent pmol des oligodésoxynucléotides S1, S2 et S5 ont été phosphorylés en 5' par 15 unités de kinase (Amersham) en présence de 5 µl du tampon kinase 10X (Amersham) et 500 pmol d'ATP (Sigma), pendant 30 min à 37°C. Les oligodésoxynucléotides phosphorylés ont été purifiés par extraction par un volume de phénol, puis un  
 10 volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) et enfin un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24:1 v/v), avant d'être précipités par 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 20 min puis centrifugés à 16060 g pendant 30 min. Les  
 15 oligodésoxynucléotides précipités ont été lavés à l'éthanol 70%, séchés, puis remis en suspension dans de l'eau à une concentration de 10 pmol/µl.

Pour relier les oligodésoxynucléotides Sens, les oligodésoxynucléotides Guides suivants ont été utilisés :

20 - G1= 5' TGTGTTGAAGGAAATCGAAAGAGAGACACA 3' (SEQ.ID15)  
 - G2= 5' GATTGGGTTTTGTGTGGCTAAGATGTGTG 3' (SEQ.ID16)  
 - G4= 5' TGTAGATGTGCCACAGAGTGGCATGCGT 3' (SEQ.ID18)

Pour réaliser la réaction LCR, 10 pmol des oligodésoxynucléotides sens S1 phosphorylé, S2 phosphorylé, S5 phosphorylé et S6 ont été  
 25 ligaturés en présence de 10 pmol des oligodésoxynucléotides guides G1, G2 et G4, 5 µl du tampon ADN ligase Taq 10X et 40 unités d'ADN Ligase Taq (New England Biolabs). La réaction de ligation est réalisé dans le thermocycleur GeneAmp PCR System 9700. Elle est constituée d'un cycle d'1 min à 94°C, et de 8 cycles identiques  
 30 constitués chacun de la succession des étapes suivantes : 1 min à 65°C, 1 min à 57°C, 1 min à 52°C, 1 min à 48°C, 1 min à 43°C, et enfin 10 min à 37°C. Puis, le mélange réactionnel de ligation a été purifié sur colonne Qiaquick selon les recommandations du fournisseur.

35 Enfin, l'amplification PCR de l'ADN simple brin obtenu a été

réalisé dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 en présence de 100 pmol de chacune des amorces oligodéoxynucléotidiques 5' CATGCTGCAGACTAGTGGATT 3', et 5' CGGGGATCCTCTAGGTTCT 3', de 50 nmol de chacun des dNTP, de 10 µl de tampon ADN polymérase Vent

5 10X (New England Biolabs), et de 2 unités d'ADN polymérase Vent (New England Biolabs). L'ADN a été dénaturé pendant 5 min à 94°C, soumis à 25 cycles constitués chacun de 30 sec de dénaturation à 95°C, de 30 sec d'hybridation à 56°C, et d'1 min d'elongation à 72°C, puis l'elongation à 72°C a été poursuivie pendant 5 min.

10 Les fragments d'ADN du milieu réactionnel ont été digérés pendant 45 min à 37°C par 20 unités de BamHI puis pendant 1 h à 37°C par 20 unités de PstI, et enfin purifiés sur colonne Qiaquick. Ils ont été insérés dans le plasmide pGEM3Z-petE prom digéré pendant 1 h à 37°C par BamHI puis pendant 1 h à 37°C par PstI, soumis à

15 l'électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, purifié sur colonne d'affinité Qiaquick, déphosphorylé pendant 1 h à 37°C en présence de 12 µl de tampon 3 10X (New England Biolabs) et de 5000 unités de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP, New England Biolabs), et enfin purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. Pour

20 réaliser la ligation, 25 ng de plasmide traité comme décrit ci-dessus ont été mis en présence de 100 ng des fragments d'ADN obtenus par PCR, en présence de 1,2 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités d'ADN ligase T4 (New England Biolabs) pendant 1 nuit à 18°C. Des bactéries *Escherichia coli*

25 DH5α, rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et a été analysé par digestions enzymatiques. La séquence promotrice

30 MPr1110 portée par ce plasmide pMRT1110 a été vérifié par séquençage.

Le fragment de 44 pb contenant les séquences as-2 et as-1 du CaMV a été obtenu en digérant 25 µg de plasmide pMRT1110 pendant 1 h à 37°C par 80 unités de PstI, puis les extrémités générées ont été

35 rendues bouts-francs par l'action de l'ADN polymérase Pfu

(Stratagene, La Jolla, USA) selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide ainsi modifié a été digéré pendant 1 h à 37°C par 4 unités de DraIII, et le fragment de 55 pb a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose Nu-Sieve 3 % (FMC, Rockland, 5 USA) et enfin purifié sur colonne d'affinité Qiaquick. La ligation a été réalisé avec 30 ng de vecteur pMRT1117 préparé comme décrit ci-dessus et 50 ng du fragment de 55 pb pendant 15 h à 18°C dans un milieu réactionnel de 20 µl en présence de 2,0 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 800 unités 10 d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la 15 méthode de lyse alcaline, et analysé par digestions enzymatiques et par amplification génique à l'aide des oligodésoxynucléotides 5' CATGCTGCAGACTAGTATCC 3' choisi sur le promoteur et 5' TTGATTTCACGGGTTGGG 3' choisi sur la séquence *uidA*. La séquence promotrice MPr1147 (SEQ.ID06) de l'un de ces clones a été vérifié 20 par séquençage.

#### 2.4. Construction du promoteur MPr1154 :

Le promoteur MPr1154 (Fig. IV) a été obtenu en déletant une séquence de 44 pb contenant le motif as-1 like du CoYMV dupliqué présente au niveau de MPr1147 (SEQ.ID04).

25 Pour ce faire, le plasmide pMRT1147 a été digéré par 20 unités de SpeI pendant 1 h à 37°C, isolé sur gel d'agarose à 0,8 %, purifié sur colonne d'affinité Qiaquick et religaturé pendant 15 h à 18°C dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités d'enzyme ADN 30 ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du mélange réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse 35 alcaline, et analysé par digestions enzymatiques et par

amplification génique à l'aide des oligodésoxynucléotides 5'  
 ATTTAGGTGACACTATAG 3' choisi sur le plasmide et 5'  
 TTGATTCACGGGTTGGG 3' choisi sur la séquence *uidA*. La séquence  
 promotrice MPr1154 (SEQ.ID07) de l'un de ces clones a été vérifié  
 5 par séquençage.

**3. Construction des plasmides binaires contenant les promoteurs  
 MPr1152, 1171, 1172 et 1092.**

La préparation du vecteur binaire a été la même pour les cassettes  
 d'expression contenant MPr1116, MPr1146, MPr1147 et MPr1092. Une  
 10 quantité de 25 µg de plasmide pGA492 (An, 1986) a été digéré par  
 80 unités de HindIII pendant 1 h à 37°C puis purifié sur colonne  
 d'affinité Qiaquick. Les extrémités 5' sortantes de ce plasmide  
 ont été rendues bouts francs en utilisant l'ADN polymérase Pfu  
 (Stratagene, La Jolla, USA) selon les recommandations du  
 15 fournisseur. Le plasmide ainsi modifié a été digéré par 80 unités  
 d'EcoRI pendant 1 h à 37°C, puis le vecteur délégué d'un fragment  
 de 291 pb a été séparé sur gel d'agarose 0,7 % et purifié sur  
 colonne d'affinité Qiaquick.

**3.1. Obtention de pMRT1152.**

20 La cassette d'expression MPr1116 / *uidA-IV2* / nos term a été  
 clonée au site HindIII modifié du plasmide binaire pGA492.  
 Elle a été obtenue à partir du plasmide pMRT1116 digéré par 80  
 unités de PstI pendant 1 h à 37°C et purifié sur colonne  
 d'affinité Qiaquick. Les extrémités 5' sortantes de ce plasmide  
 25 ont été rendues bouts-francs en utilisant l'ADN polymérase Pfu  
 (Stratagene, La Jolla, USA) selon les recommandations du  
 fournisseur. Le plasmide ainsi modifié a été digéré simultanément  
 par 80 unités d'EcoRI et 40 unités de XmnI pendant 1 h à 37°C,  
 puis le fragment d'ADN de 2,5 kb correspondant à la cassette  
 30 d'expression a été séparé sur gel d'agarose 1 % et purifié sur  
 colonne d'affinité Qiaquick.

La ligation a été réalisé en mélangeant 100 ng de plasmide binaire  
 pGA492 préparé comme décrit ci-dessus et 50 ng de cassette  
 d'expression pendant 1 nuit à 18°C dans un volume réactionnel de

35 20 µl en présence de 2 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England

Biolabs) et 400 unités d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs). Des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du milieu réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones 5 obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en tétracycline (12 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et analysé par digestions enzymatiques ainsi que par amplification génique à l'aide des oligodésoxynucléotides 5'  
 ATATGAGACTCTAATTGGATACCGAGGGG 3' choisi sur l'ADN de transfert du 10 plasmide binaire et 5' TTGATTCACGGGTTGGG 3' choisi sur la cassette d'expression au niveau de la séquence *uidA*. Le clone résultant est appelé pMRT1152.

### 3.2. Obtention du plasmide binaire pMRT1171.

La cassette d'expression MPr1146 / *uidA-IV2* / *nos* term a été 15 clonée au site HindIII modifié du plasmide binaire pGA492 en suivant le même protocole que pour le plasmide pMRT1152, excepté que la cassette d'expression a été isolée à partir du plasmide pMRT1146. Le clone résultant a été appelé pMRT1171.

### 3.3. Obtention du plasmide binaire pMRT1172.

20 La cassette d'expression MPr1147 / *uidA-IV2* / *nos* term a été clonée au niveau du site HindIII modifié du plasmide binaire pGA492 en suivant le même protocole que pour le plasmide pMRT1152, excepté que la cassette d'expression a été isolée à partir du plasmide pMRT1147. Le clone résultant a été appelé pMRT1172.

### 25 3.4. Obtention du plasmide binaire pMRT1182.

Les fragments promoteur MPr1092 et séquence *uidA-IV2* / *nos* term ont été insérés dans le plasmide binaire pGA492 préparé comme décrit ci-dessus. Les deux fragments ont été préparés de la manière suivante :

30 - CaMV D35S prom a été isolé en digérant 10  $\mu$ g du plasmide pJIT163 $\Delta$  par 40 unités de KpnI pendant 1 h à 37 °C. Les extrémités de ce plasmide linéarisé ont été rendues bouts-francs à l'aide de 6 unités de l'ADN polymérase T4 (New England Biolabs) pendant 30 min à 37°C selon les recommandations du fabricant. Le plasmide 35 ainsi modifié a été purifié sur colonne d'affinité Qiaquick, puis

redigérés par 80 unités de HindIII pendant 1 h à 37°C. Le fragment de 743 pb correspondant au promoteur a été séparé sur gel d'agarose à 0,8 %, puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick.

- La cassette "uidA-IV2/nos term" a été obtenue en digérant 4 µg du plasmide pMRT1092 par 40 unités de HindIII et d'EcoRI pendant 1 h. Le fragment de 2,2 kb correspondant à la séquence uidA-IV2/nos term a été séparé sur gel d'agarose à 0,8 %, puis purifié sur colonne d'affinité Qiaquick.

La ligation entre les trois fragments a été réalisé en mélangeant 100 ng de plasmide binaire, 50 ng de fragment promoteur et 50 ng du fragment correspondant à la séquence "uidA-IV2/nos term" dans un volume réactionnel de 20 µl, en présence de 2 µl du tampon ADN ligase T4 10X (New England Biolabs) et 400 unités d'enzyme ADN ligase T4 (New England Biolabs). L'incubation a été réalisé dans 15 un thermocycleur en soumettant le mélange de ligation à 198 cycles constitués chacun de 30 sec d'incubation à 30°C, et de 30 sec d'incubation à 10°C. Des bactéries *Escherichia coli* DH5α, rendues préalablement compétentes, ont été transformées par la moitié du milieu réactionnel de ligation. L'ADN plasmidique des clones 20 obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en tétracycline (12 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline et analysé par digestions enzymatiques et amplification génique à l'aide des oligodésoxynucléotides 5' ATATGAGACTCTAATTGGATACCGAGGGG 3' choisi sur l'ADN de transfert du plasmide binaire et 5' 25 TTGATTCACGGGTTGGG 3' choisi sur la cassette d'expression au niveau de la séquence uidA. L'un des clones retenu a été dénommé pMRT1182.

Les plasmides pMRT1152, pMRT1171, pMRT1172 et pMRT1182 ont été transférés dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 30 selon la technique décrite par Holsters et al. (1978). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur milieu LB supplémenté en Rifampicine (50 mg/l) et en Tétracycline (5 mg/l), a été extrait selon la méthode de lyse alcaline, modifiée en ajoutant du lysozyme (25 mg/ml) dans le tampon de resuspension des 35 cellules. L'ADN plasmidique obtenu a été analysé par digestions

enzymatiques et par amplification génique à l'aide des oligodésoxynucléotides 5' ATATGAGACTCTAATTGGATACCGAGGGGG 3' choisi sur le plasmide et 5' TTGATTTCACGGGTTGGG 3' choisi sur la cassette d'expression. Les clones d'agrobactéries obtenus ont été utilisés 5 en transformation génétique végétale.

**4. Mesure et comparaison des niveaux d'expression des différentes promoteurs par la méthode d'expression transitoire.**

**4.1. Culture *in vitro* du tabac, préparation des feuilles.**

Les expériences d'expression transitoire ont été réalisées sur des 10 feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) du cultivar PBD6 âgées de 6 semaines. Des graines matures de tabac cv. PBD6 ont été stérilisées pendant 10 min dans une solution d'hypochlorite de calcium saturée (70 g/l), puis rincées trois fois pendant 5 min dans l'eau déionisée stérile. Les graines stériles ont été 15 déposées sur milieu MS20 (Murashige et Skoog, 1962) et incubées pendant 6 semaines en chambre de culture (température constante de 24°C, photopériode 16 h nuit / 8 h jour, intensité lumineuse de 200  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ ).

Afin d'éviter l'éclatement des cellules du mésophylle foliaire 20 lors de la transformation, les 2 feuilles principales des plantes de tabac PBD6 âgées de 6 semaines ont été excisées de la plante 24 h avant transformation par biolistique, et déposées, face ad-ligneuse vers le haut, sur milieu BY3 de plasmolyse douce (Sels MS 4,4 g/l, myoinositol 100 mg/l, thiamine 1 mg/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200 mg/l, 25 Saccharose 30 g/l, Sorbitol 45,5 g/l, 2,4 D 1 mg/l, pH 5,8).

**4.2. Enrobage des particules d'or par l'ADN des constructions chimériques.**

La transformation par biolistique nécessite le dépôt préalable de l'ADN sur des billes d'or sphériques de 0,6  $\mu\text{m}$  de diamètre 30 stérilisées 10 min dans l'éthanol absolu (99,98 %, à moins de 0,02 % d'eau), lavées quatre fois dans l'eau déionisée stérile, et enfin conservées pendant 4 semaines maximum à -20°C dans une solution de glycérol à 50%.

La concentration de l'ensemble des plasmides contrôles et essais, 35 utilisés durant la transformation a été ajustée à 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Dans

chacune des expériences de transformation, un contrôle interne de référence (pCaMV35S1uc) a été cotransformé afin de normaliser les variations de l'activité GUS entre les différentes expériences (Leckie et al., 1994).

5 L'enrobage de l'ADN sur les billes d'or ainsi préparées a été réalisé en enceinte stérile à flux laminaire. Une fraction aliquote de 1,8 mg de suspension de billes stériles dans 30 µl de glycérol 50 %, a été mélangée vigoureusement au vortex pendant 1 min, puis pendant 10 sec avec 20 µl de suspension d'ADN contenant 10  $4 \mu\text{g}$  de l'un des plasmides à tester et 2 µg du plasmide de référence pCaMV35S1uc. Puis, 20 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M ont été ajoutés et mélangés vigoureusement pendant 10 sec. Ensuite, 20 µl de spermidine 0,1 M ont été ajoutés au mélange et l'ensemble a été agité au vortex pendant 30 sec supplémentaires. L'enrobage de 15 l'ADN sur les billes a été poursuivi en incubant le mélange dans la glace pendant 15 min, puis les billes enrobées ont été centrifugées à faible vitesse pendant 5 sec et lavées deux fois dans l'éthanol absolu.

Après lavage, les billes enrobées ont été remises en suspension 20 dans 32 µl d'éthanol absolu, soniquées 3 fois 2 sec, mélangés vigoureusement au vortex pendant 15 sec, puis immédiatement réparties en 4 parties aliquotes identiques sur les disques "macrocarriers" stériles du système Biolistic PDS-1000/He préparés selon les recommandations du fournisseur (Bio-Rad, Hercule, USA).

25 L'ensemble "support du macrocarrier / macrocarrier portant le dépôt de billes", a été mis à sécher pendant 5 min.

#### 4.3. Bombardement des tissus foliaires de tabac et expression transitoire.

Le bombardement des feuilles de tabac a été effectué à l'aide du 30 système Biolistic PDS-1000/He en suivant les recommandations générales du fournisseur (Bio-Rad, Hercule, USA) concernant les manipulations et montages des différents éléments de l'appareil. Chaque feuille a été bombardée deux fois successivement en suivant les caractéristiques de tir suivantes :

- la pression d'hélium choisie pour accélérer les billes est de 6200 kPa (900 psi).
- l'échantillon végétal a été placé à 9 cm de la zone d'accélération des billes.

5 - le tir a été effectué sous une atmosphère en dépression de 27 mm de mercure.

Après bombardement les feuilles ont été laissées sur milieu BY3 et incubées 48 h à l'obscurité en salle de culture à 24°C. Cette incubation doit permettre l'expression transitoire des transgènes 10 introduits dans les cellules.

#### 4.4. Evaluation de l'activité des différents promoteurs par coloration histochimique.

La révélation de l'expression de la  $\beta$ -glucuronidase a été réalisé par coloration histochimique comme décrit par Jeffersson *et al.* 15 (1987). Après 48 h en chambre de culture, chaque feuille a été coupée en deux selon l'axe de la nervure centrale. La moitié de la feuille a été incubée dans du tampon de coloration de la  $\beta$ -glucuronidase (5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl glucuronide (X-Gluc) 500 mg/l, Triton x100 0,05% dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 20 7,0) pendant 48 h à 37°C, alors que l'autre moitié a été congelée dans l'azote liquide, puis conservée à -80°C.

Après coloration, les feuilles ont été dépigmentées par passage dans deux bains d'éthanol 95 % pendant respectivement 3 et 12 h, puis rincées dans l'eau distillée et séchées à plat entre deux 25 feuilles de cellophane.

Les résultats de ces colorations histochimiques sont présentés Fig. V. L'activité promotrice des différentes constructions a été évaluée par le nombre de points bleus révélés sur chaque feuille après deux bombardements totalisant 2  $\mu$ g d'ADN portant le gène 30 rapporteur GUS.

Deux catégories de promoteurs ont été identifiées. Les feuilles bombardées avec les promoteurs MPr1116 et MPr1146 présentent en moyenne un nombre de points bleus très importants supérieurs à 150 (Fig. V) comparable au nombre de points bleus obtenus en 35 bombardant les feuilles dans les mêmes conditions et avec la même

quantité de plasmide contrôle pMRT1092. Les feuilles bombardées par le promoteurs MPr1117 et MPr1147 présentent un nombre de points bleus compris en moyenne entre 50 et 150 (Fig. V).

En conclusion, les promoteurs chimériques Mpr1116 et MPr1146

5 permettent d'obtenir une expression de la  $\beta$ -glucuronidase à un niveau supérieur ou égal à celle obtenue à l'aide du promoteur constitutif fort de référence D35S prom.

#### 4.5. Quantification de l'expression de la $\beta$ -glucuronidase par les différents promoteurs, par dosage enzymatique au luminomètre.

10 Les demi-feuilles congelées ont été broyées dans un mortier, puis la poudre a été mise à décongeler dans du tampon d'extraction (Tris Phosphate 25 mM pH 7,8, Dithiothréitol 2 mM, acide 1,2-diaminocyclohexane, N,N,N',N'-tétracétique 2 mM, glycérol 10 %, Triton X100 1 %) à raison de 1 ml de tampon pour 200 mg de

15 tissu. Le mélange a été homogénéisé puis incubé pendant 15 min dans la glace avant d'être clarifié par centrifugation pendant 5 min à 16060 g.

L'activité GUS a été mesurée sur 20  $\mu$ l d'extrait brut clarifié de feuille à l'aide du kit de détection "GUS-Light chemiluminescent

20 reporter gene assay" (Tropix Inc., Bedford, USA) selon les recommandations du fournisseur. La mesure de l'émission de lumière a été effectuée à l'aide d'un luminomètre Lumat LB 9507 (EGG-Berthold, Bad Wildbad, Allemagne).

L'activité luciférase a été mesurée sur 20  $\mu$ l d'extrait brut de

25 feuille à l'aide du kit de détection "Luciferase assay system" (Promega Corp., Madison, USA) selon les recommandations du fournisseur. La mesure de l'émission de lumière a été effectuée à l'aide du luminomètre Lumat LB 9507.

Les résultats sont rapportés Fig. VI. Pour chaque essai (une

30 feuille bombardée = un extrait brut), le rapport entre l'activité  $\beta$ -glucuronidase et l'activité luciférase mesurées au luminomètre, a été calculé. La moyenne des différents essais pour une construction donnée et l'erreur standard à la moyenne ont été déterminées. Les résultats obtenus montrent que :

35 Les promoteurs MPr1116 et MPr1146 (Fig. IV) semblent augmenter

sensiblement l'expression du promoteur double 35S du CaMV de référence (MPr1092, Fig. II). Le promoteur MPr1146 diffère du promoteur MPr1116 par l'insertion d'une duplication de la boîte "as-2" précédant la boîte "as-1" du promoteur 35S du CaMV

5 localisée entre la boîte "as-1 like" du promoteur du CoYMV et l'élément spécifique des tissus verts du promoteur du CsVMV. Cette insertion d'éléments du promoteur 35S du CaMV dans MPr1146 semble augmenter faiblement le taux d'expression moyen par rapport au promoteur MPr1116 (4,5 %). Ces éléments semblent impliqués dans

10 une synergie positif dans une telle combinaison.

Les promoteurs MPr1116 et MPr1117 (Fig. IV) ne diffèrent que par l'ajout d'un boîte "as-1 like" du promoteur de CoYMV dans MPr1117. L'expression moyenne conférée par le promoteur MPr1117 est sensiblement inférieure à celle obtenue avec MPr1116 (22 %).

15 Ce résultat suggère que l'élément "as-1 like" du CoYMV localisé en 5' du promoteur chimérique jouerait un rôle répresseur de l'activité promotrice.

Le promoteur MPr1147 (Fig. IV) diffère du promoteur MPr1117 par l'insertion des boîtes "as-1" et "as-2" entre les éléments "as-1 like" du promoteur du CoYMV et l'élément spécifique des tissus verts du promoteur du CsVMV. L'ajout de ces boîtes en interaction avec les autres éléments semblent conduire à une diminution significative et considérable du taux d'expression moyen par rapport à MPr1117 (43 %).

20 L'association de ces éléments semble favoriser une synergie négative. Néanmoins, l'expression la plus faible conférée par le promoteur MPr1147 ne diffère que de 51 % de celle obtenue avec le promoteur MPr1092. Cet effet négatif pourrait être expliqué, dans le cas de ce promoteur chimérique, par une compétition vis à vis des éléments trans-activateurs ou

25 bien par un encombrement stérique de ces facteurs sur le promoteur, diminuant son activité.

En conclusion, les promoteurs chimériques MPr1116 et MPr1146 semblent engendrer une expression moyenne du gène rapporteur GUS au niveau des feuilles de tabac, sensiblement meilleure que celle

30 obtenue avec MPr1092. Celui-ci étant communément rapporté dans la littérature comme étant le promoteur chimérique le plus fort (de

l'ordre de 10 fois supérieur au promoteur constitutif fort CaMV p35S (Kay et al., 1987), utilisé en routine en transgénèse MPr1116 et MPr1146 peuvent être classés parmi les promoteurs chimériques les plus fort décrit à ce jour.

5 Les promoteurs de plus faible expression peuvent présenter un intérêt en tant que promoteurs utilisables pour conférer une résistance à des antibiotiques pour les besoins de la sélection, par exemple, de la même manière que les promoteurs type "nos".

5. Expression des différents promoteurs dans le tabac après 10 transformation stable.

5.1. Transformation stable dans le tabac.

La transformation du tabac (*Nicotiana tabacum* L., cultivar PBD6) a été réalisé en infectant des disques foliaires isolés de plantes de tabac âgées de 6 semaines par les agrobactéries recombinantes 15 selon la méthode décrite par Horsch et al. (1985).

Tout au long de la transformation, les boîtes de Pétri ont été incubées en chambre de culture dans les conditions suivantes : température de 24°C, photopériode de 16 h nuit / 8 h jour, intensité lumineuse de 200  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ , et hormis pour 20 l'étape initiale de coculture, l'ensemble des étapes de callogénèse, de régénération et d'enracinement a été réalisé sur divers milieux sélectifs supplémentés en Augmentin ® (400 mg/l) et Kanamycine ® (200 ou 100 mg/ml) ;

Les différentes étapes et les milieux utilisés sont les suivants : 25 - une étape de coculture de trois jours, lors de laquelle les agrobactéries infectent les cellules végétales, sur milieu de coculture MS30 solide (milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de vitamines (Gamborg et al., 1968) 4,4 g/l (Sigma, M0404), Saccharose 30 g/l, agar 8 g/l (Merck), pH 5,7) 30 supplémenté en Benzyl Amino Purine à 1 mg/l et Acide Indole-3 Acétique à 0,1 mg/l .

- une étape de formation des bourgeons de deux fois 2 semaines en chambre de culture sur milieu de régénération MS20 solide (Sels et vitamines MS 4,4 g/l (Sigma, M0404), Saccharose 20 g/l, agar 8 g/l (Merck), pH 5,7), supplémenté en Benzyl Amino Purine à 1 mg/l,

Acide Indole-3 Acétique à 0,1 mg/l, Augmentin® à 400 mg/l et Kanamycine® à 200 mg/l.

- une étape de développement et d'enracinement de 3 semaines en chambre de culture sur milieu de développement MS20 solide

5 supplémenté en Augmentin® à 400 mg/l et Kanamycine® à 100 mg/l.

- une étape de repiquage en pots de verre en chambre de culture sur milieu de développement MS20 solide supplémenté en Augmentin® à 400 mg/l et Kanamycine® à 100 mg/l.

5.2. Mesure et comparaison de l'activité  $\beta$ -glucuronidase dans les 10 plantes de tabac.

L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée sur des échantillons de plantes transgéniques de première génération, prélevés 2 semaines après leur acclimatation en serre. Pour chaque plante, trois échantillons de feuille ont été prélevés, sur une feuille "âgée"

15 (située au rang foliaire basal), sur une feuille mature (située au rang foliaire médian), et sur une feuille jeune (située à l'apex). Chaque échantillon a été broyé dans l'azote liquide dans un mortier puis la poudre a été resuspendue dans du tampon

d'extraction (Tris Phosphate 25 mM pH 7,8, Dithiothréitol 2 mM, 20 acide 1,2-diaminocyclohexane, N,N,N',N'-tétracétique 2 mM, glycérol 10 %, Triton X100 1 %) à raison d'1 ml de tampon pour 200 mg de tissu. Le mélange a été homogénéisé puis incubé pendant 15 min dans la glace avant d'être clarifié par centrifugation pendant 5 min à 16060 g.

25 L'activité GUS a été mesurée sur 20  $\mu$ l d'extrait brut clarifié de feuille à l'aide du kit de détection "GUS-Light chemiluminescent reporter gene assay" (Tropix Inc., Bedford, USA) selon les recommandations du fournisseur. La mesure de l'émission de lumière à été effectuée à l'aide d'un luminomètre Lumat LB 9507

30 (EGG-Berthold, Bad Wildbad, Allemagne).

La quantité de protéine totales présentes dans l'extrait brut a été mesurée selon la technique de Bradford (1976), en utilisant le réactif "Bio-Rad protein assay" (Bio-Rad, München, Allemagne).

Références citées

An G. (1986). Development of plant promoter expression vector and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol.* 81, 86-91.

Barany F. (1991). The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl.* 1, 5-16.

Birnboim H. C. et Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Ac. Res.* 7, 1513.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the detection of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Fromm M.E., Taylor L.P. et Walbot V. (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, 319, 791-793.

Gamborg O.L., Miller R.A. et Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.

Gaubier P., Raynal M., Hull G., Huestis G.M., Grellet F., Arenas C., Pages M. et Delseney M. (1993). Two different Em-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during germination. *Mol. Gen. Genet.* 238, 409-418.

Guérineau et Mullineaux (1993). In *Plant molecular biology labfax*, Croy R.R.D. (Ed.), BioS Scientific Publishers, Blackwell Scientific Publications.

Jefferson R.A., Burgess S.M. et Hirsh D (1986). b-Glucuronidase as a gene-fusion marker. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83, 8447-8451.

Jefferson R.A., Kavanagh T.A. et Bevan M.W. (1987). GUS fusions : b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557.

Holsters M., Dewaele D., Depicker A., Messenf E., Van Montagu M. et Schell J. (1978). Transfection and transformation of

*Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 136, 181-187.

Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eiholtz D., Rogers S.G. et Fraley R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227, 129-1231.

5 Kay R., Chan A., Daly M. et McPherson J. (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science 236, 1299-1302.

Lam E., Benfey P. N., Gilmartin P. M., Fang R. X. et Chua N. H. (1989). Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and 10 change promoter expression pattern in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7890-7894.

Lam E. et Chua N. H. (1989). ASF-2 : a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. Plant Cell, 1, 1147-1156.

15 Last D. I. et Gray J. C. (1989). Plastocyanin is encoded by a single-copy gene in the pea haploid genome. Plant Mol. Biol. 12, 655-666.

Leckie L., Devoto A. et De Lorenzo G. (1994). Normalization of GUS by LUC activity from the same cell extract reduces transformation 20 variability. Biotechniques 17, 52-56.

Murashige T. et Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.

Medberry S. L., Lockhart B. E. L. and Olszewski N. E. (1992). The 25 Commelina Yellow Mottle Virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. Plant Cell, 4, 185-192.

Pwee K.H. et Gray J.C. (1993). The pea plastocyanin promoter directs cell-specific but not full light-regulated expression in transgenic tobacco plants. Plant J. 3, 437-449.

30 Sanger F., Nicklen S. et Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.

Torrent M., Alvarez I., Geli M.I., Dalcol I. et Ludevid D. (1997). Lysine-rich modified g-zein accumulate in protein bodies of 35 transiently transformed maize endosperms. Plant Mol. Biol. 34, 139-149.

Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L. et  
Rocha-Sosa M. (1990). Construction of an intron-containing marker  
gene : Splicing of the intron in transgenic plants and its use in  
monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant  
5 transformation. Mol. Gen. Genet. 220, 245-250.

Verdaguer B., De Kochko A., Beachy R. N. and Fauquet C. (1996).  
Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants of  
the Cassava Vein Mosaic Virus (CsVMV) promoter. Plant Mol. Biol.  
31, 1129-1139.

## LISTAGE DE SEQUENCE

&lt;110&gt; MERISTEM THERAPEUTICS

5 <120> PROMOTEURS CHIMERIQUES D'EXPRESSION, CASSETTES  
 D'EXPRESSION, VECTEURS, PLANTES ET SEMENCES  
 TRANSG□NIQUES LES LES CONTENANT, ET METHODES DE LEUR

OBTENTION.

10

&lt;130&gt; Promoteur Chim,rique CoYMV/CsVMV

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

15

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

20 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 243

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial Sequence

25 &lt;220&gt;

<223> Fragment de 243 pb du promoteur de la r,gion inter  
 g,nique du Commelina Yellow Mosaic Virus

&lt;220&gt;

30 &lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(243)

&lt;300&gt;

&lt;301&gt; Medberry, S. L.

35 Lockhart, B. E.

Olszewski, N. E.

<302> The Commelina Yellow Mottle Virus promoter is a strong  
 promoter in vascular and reproductive tissues.

&lt;303&gt; Plant Cell

40 &lt;304&gt; 4

&lt;306&gt; 185-192

&lt;307&gt; 1992

&lt;313&gt; 1 JUSQU'A 243

45 &lt;400&gt; 1

atccggccgtc atcaatgaca tcatcacagt actgaggaga tgaatactta gccatgaagt 60  
 agcggtcgaa tattacctat gcctttattc gcagcgtag tggcactgaa aggataaag 120  
 ttgttcgtt cttatcaaaa acgaatctta tcttgtaaac ttggttaccc ggtatgccgg 180  
 ttcccaagct ttatccctt attaagcac ttgtgtacta gcttagaaaa ccaacacaac 240

aac

243

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 515

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Promoteur de la r,gion inter g,nique du Cassava

10 Vein Mosaic Virus d'une s,quence de 515 pb EMBL  
U59751

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

15 &lt;222&gt; (1)..(515)

&lt;300&gt;

&lt;301&gt; Verdaguer, B.

De Kochko, A.

20 Beachy, R. N.

Fauquet, C.

<302> Isolation and expression in transgenic tobacco and rice  
plants of the Cassava Vein Mosaic Virus (CsVMV)  
promoter.

25 &lt;303&gt; Plant Mol. Biol.

&lt;304&gt; 31

&lt;306&gt; 1129-1139

&lt;307&gt; 1996

&lt;308&gt; EMBL U59751

30

&lt;400&gt; 2

ccagaaggta attatccaag atgttagcatc aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg 60  
gaagtattat gtgagctcg caagaagcag atcaaatatgc ggcacatatg caacctatgt 120  
tcaaaaatga agaatgtaca gatacaagat cctatactgc cagaatacga agaagaatac 18035 gtagaaaattg aaaaagaaga accaggcgaa gaaaagaatc ttgaagacgt aagcactgac 240  
gacaacaatg aaaagaagaa gataaggctcg gtgattgtga aagagacata gaggacacat 300  
gtaaggctgaa aatgttaagg gcggaaagta accttatcac aaaggaatct tatccccac 360  
tacttacatc ttatatttt tccgtgtcat tttgccctt gagtttcctt atataaggaa 420  
ccaaggttcgg catttgtgaa aacaagaaaa aatttgtgt aagctattt ctttgaagta 480

40 ctgaggatac aacttcagag aaatttgtaa gtttg

515

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 317

&lt;212&gt; ADN

45 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Promoteur MPr1116

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(317)

5 <400> 3  
aagcttgcat gctgcagact agtatccgcc gtcataatg acatcatcac agtactgagg 60  
agatgaatag ctggccatga cactctgtgc gaatattgaa gacgtaagca ctgacgacaa 120  
caatgaaaag aagaagataa ggtcggtatgtgaaagag acatagagga cacatgtaa 180  
gtggaaaatg taagggcgga aagtaacctt atgcattgt aacttggta cccggatgc 240  
0 cggttcccaa gctttatttc cttatataag cacttgtta gtatgttgc aaaccaacac 300  
aacaacccatggatcc 317

15 <211> 348  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

20  
<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(348)

25 <400> 4  
aagcttgcat gcctgcagac tagtatccgc cgtcatcaat gacatcatca gactagtatc 60  
cgccgtcataatgacatca tcacagtact gaggagatga atagctagcc atgacactct 120  
gtgcgaatat tgaagacgta agcactgacg acaacaatga aaagaagaag ataaggctcg 180  
tgattgtgaa gagacataga ggacacatgt aagttggaaa atgtaaaggc ggaaagaataac 240  
30 cttatgcatt tgtaacttgg ttacccggta tgctggttcc caagctttat ttccttattt 300  
aaacttgtgt agtagcttag aaaaccaaca caacaaccta gaggatcc 348

35 <211> 371  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Promoteur MPr1146

40  
<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(371)

45 <400> 5  
aagcttgcat gctgcagact agtatccgcc gtcatcaatg acatcatcac agtactgagg 60  
agatgaatag ctatgtattt atgtgatatac aagattgtatg tgatatactcc actgacgtaa 120  
gggatgacgc atgccactct gtgcgaatat tgaagacgtt agcactgacg acaacaatgtt 180  
aaagaagaag ataagggtcggt tgattgtgaa agagacatgtt aggcacatgtt taagggtggaa 240

aatgttaaggg cgaaaaagtaa ccttatgcat ttgttaacttg gttacccgggt atgcgggttc 300  
 ccaagctta ttcccttatt taagcacttg tgttagtagct tagaaaacca acacaacaac 360  
 ctagaggatc c

371

5 <210> 6  
 <211> 398  
 <212> ADN  
 <213> Artificial Sequence

10 <220>  
 <223> Promoteur MPr1147

<220>  
 <221> promoter  
 15 <222> (1)..(398)

<400> 6  
 aagcttgcac gcctgcagac tagtatccgc cgtcatcaat gacatcatca gactagtatc 60  
 cgccgtcata aatgacatca tcacagtact gaggagatga atagcttagcc tgcagactag 120  
 20 tggattgtatg tgatatatctcc actgacgtaa gggatgacgc atgccactct gtgcgaatat 180  
 tgaagacgtt agcactgacg acaacaatga aaagaagaag ataaggtcgg tgattgtgaa 240  
 gagacataga ggacacatgt aaggtggaaa atgtaaggcc ggaaagtaac cttatgcatt 300  
 tctaacttgg ttacccggta tgctggttcc caagctttat ttcccttattt aaacttgg 360  
 agtagcttag aaaaccaaca caacaaccta gaggatcc 398

25 <210> 7  
 <211> 301  
 <212> ADN  
 <213> Artificial Sequence

30 <220>  
 <223> Promoteur MPr1154

<220>  
 35 <221> promoter  
 <222> (1)..(301)

<400> 7  
 aagcttgcac gcctgcagac tagtggattt atgttatc tccactgacg taagggatga 60  
 40 cgcacccac tctgtgcgaa tatttgaagac gtaagcactg acgacaacaa tgaaaagaag 120  
 aagataaggt cgggtattttt gaagagacat agaggacaca tggtaagggtgg aaaaatgtt 180  
 ggcggaaagt aacccatgc attttgttact tggttaccccg gtatgctgg tcccaagctt 240  
 tattccctta tttaaacttg tgttagtagct tagaaaacca acacaacaac ctagaggatc 300  
 c 301

45 <210> 8  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Motif d, soxynucl, otidique de construction "sens"  
 S1

5 <400> 8  
 catgctgcag actagtatcc gccgtcatca atgacatcat cacagtactg aggagatgaa 60  
 tagct 65

10 <210> 9  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Artificial Sequence

15 <220>  
 <223> Motif d, soxynucl, otidique de construction "sens"  
 S2

<400> 9

20 agccatgaca ctctgtgcga atattgaaga cgtaagcact gacgacaaca atgaaaagaa 60  
 <210> 10  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Motif d, soxynucl, otidique de construction "sens"  
 S3

30 <400> 10  
 gaagataagg tcggtgattg tgaaagagac atagaggaca catgttaaggt ggaaaatgt 60  
 ag 62

35 <210> 11  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Artificial Sequence

40 <220>  
 <223> Motif d, soxynucl, otidique de construction "sens"  
 S4

<400> 11

45 ggcggaaagt aaccttatgc atttgtaact tggttacccg gtatgccgt tcccaagctt 60  
 tat 63

<210> 12  
 <211> 63

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Motif d,soxynucl,otidique de construction "sens"  
S5

<400> 12

10 ttccttattt aagcacttgt gtagtagctt agaaaaccaa cacaacaacc tagaggatcc 60  
ccg 63

<210> 13

<211> 63

<212> ADN

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Motif d,soxynucl,otidique de construction "sens"  
S6

20

<400> 13

catgctgcag actagtggat ttagtgcata tctccactga cgtaaggat gacgcattcc 60  
act 63

25 <210> 14

<211> 79

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Motif d,soxynucl,otidique de construction "sens"  
S7

<400> 14

35 catgctgcag actagtggatt gatgtgatca caagattgtat gtatctc cactgacgta 60  
aggatgacg catgccact 79

<210> 15

<211> 34

40 <212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Motif de guidage d,soxynucl,otidique de  
construction G1

<400> 15

gactcctcta ttatcgatc ggtactgtga gaca

<210> 16  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

5

<220>  
<223> Motif de guidage d, soxynucl, otidique de  
construction G2

10 &lt;400&gt; 16

gctgttgtta cttttcttct tctattccag cca

33

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 31

15 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

20 <223> Motif de guidage d, soxynucl, otidique de  
construction G3

&lt;400&gt; 17

attccacattt ttacattccc gccttcatt g

31

25 &lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial Sequence

30 &lt;220&gt;

<223> Motif de guidage d, soxynucl, otidique de  
construction G4

&lt;400&gt; 18

35 caagggttcg aaataaaagga ataaattcgt ga

32

## REVENDICATIONS

- 1) Promoteur chimérique d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un premier promoteur végétal comportant une région promotrice de l'expression vasculaire végétale, ladite région promotrice vasculaire végétale étant remplacée par une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un deuxième promoteur végétal et comportant une région promotrice de l'expression dans des tissus verts végétaux.
- 5 2) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit premier promoteur végétal provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV) et ledit deuxième promoteur végétal provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV).
- 10 3) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les séquences d'acide nucléique proviennent des régions intergéniques des premier et deuxième promoteurs.
- 15 4) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID01 fusionnée à au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID02.
- 20 5) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur chimérique consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID03.
- 25 6) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID04.
- 30 7) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID05.
- 35 8) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence

d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID06.

9) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence

5 d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID07.

10) Promoteur chimérique d'expression comprenant un promoteur d'origine virale, dont une partie consiste en un élément exogène promoteur de l'expression dans des tissus végétaux verts (GT).

10 11) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'élément exogène promoteur GT est également d'origine virale.

12) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 10, caractérisé en ce que le promoteur d'origine virale provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV).

13) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'élément exogène promoteur provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV).

14) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 20 10, caractérisé en ce que l'élément exogène GT remplace l'élément endogène promoteur de l'expression dans les tissus vasculaires (VT) du promoteur d'origine virale.

15) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en 25 outre au moins une boîte "endosperme like".

16) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une boîte "asl like" liée de manière opérationnelle en amont de l'élément promoteur dans les tissus

30 végétaux verts GT.

17) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une boîte "asl" liée de manière opérationnelle en amont de l'élément promoteur dans les tissus végétaux GT.

35 18) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en

outre au moins une boîte "as2" liée de manière opérationnelle en amont de l'élément promoteur dans les tissus verts végétaux GT.

19) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications 10 à 18 précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence choisie parmi le groupe consistant en SEQ.ID02, SEQ.ID03, SEQ.ID04, SEQ.ID05, SEQ.ID06, et SEQ.ID07.

20) Cassette d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un premier promoteur végétal 10 comportant une région promotrice de l'expression vasculaire végétale, ladite région promotrice vasculaire végétale étant remplacée par une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un deuxième promoteur végétal et comportant une région promotrice de l'expression dans des tissus verts végétaux, les séquences 15 étant liées de manière opérationnelle à une séquence d'acide nucléique à exprimer codant pour un polypeptide à produire, elle même liée à une séquence d'acide nucléique de terminaison de transcription.

21) Cassette d'expression selon la revendication 20, 20 caractérisée en ce que ledit premier promoteur végétal provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV) et ledit deuxième promoteur végétal provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV).

22) Cassette d'expression selon la revendication 20 25 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID01 fusionnée à au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID02.

23) Cassette d'expression selon la revendication 20, 30 caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID03.

24) Cassette d'expression selon la revendication 28, 35 caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID04.

25) Cassette d'expression selon la revendication 20, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID05.

5 26) Cassette d'expression selon la revendication 20, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID06.

27) Cassette d'expression selon la revendication 20, 10 caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID07.

28) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend une fusion d'au moins une partie de 15 chacune des séquences identifiées sous les numéros SEQ.ID01 et SEQ.ID02.

29) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID03.

20 30) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID04.

31) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la 25 séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID05.

32) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID06.

33) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la 30 revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID07.

34) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 35 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID08.

35) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID09.

36) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID10.

37) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID11.

38) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID12.

39) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID13.

40) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID14.

41) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID15.

42) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il

5 correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID16.

43) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il

10 correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID17.

44) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il

15 correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID18.

45) Vecteur comprenant un promoteur, ou une séquence d'acide nucléique promotrice, capable d'initier la transcription d'une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide à produire, caractérisé en ce que le promoteur ou la séquence

20 d'acide nucléique promotrice isolé correspond à un promoteur chimérique d'expression ou à une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33.

46) Vecteur selon la revendication 45, caractérisé en ce qu'il

25 est choisi dans le groupe consistant en les vecteurs binaires identifiés sous les numéros pMRT1152, pMRT1171, pMRT1172.

47) Procédé d'obtention d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33,

30 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- effectuer une réaction de ligation en chaîne, appelée LCR, produisant un ADN simple brin continu à partir d'au moins un motif désoxynucléotidique de construction choisi parmi le groupe consistant en les désoxynucléotides "sens" S1, S2, S3,

35 S4, S5, S6, et S7 identifiés sous les numéros SEQ.ID08,

SEQ.ID09, SEQ.ID10, SEQ.ID11, SEQ.ID12, SEQ.ID13 et SEQ.ID14 respectivement, et au moins un motif de guidage désoxynucléotidique de construction de ladite séquence d'acide nucléique promotrice ou du promoteur choisi parmi le groupe 5 consistant en les désoxynucléotides de guidage G1, G2, G3, et G4 identifiés sous les numéros SEQ.ID15, SEQ.ID16, SEQ.ID17 et SEQ.ID18 respectivement;

- effectuer une amplification PCR sur le simple brin obtenu dans l'étape précédente permettant d'obtenir un ADN double brin 10 correspondant au promoteur chimérique d'expression ou à la séquence d'acide nucléique promotrice;

- éventuellement isoler le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice.

48) Procédé selon la revendication 47, caractérisé en ce que 15 l'on phosphoryle les motifs désoxynucléotidiques de construction avant ligation.

49) Procédé selon la revendication 47, caractérisé en ce que la ligation s'effectue en présence d'au moins une ligase d'ADN dans un thermocycleur, selon les conditions suivantes :

20 - un cycle d'environ une minute à environ 94°C ;  
- huit cycles identiques chacun composé de la succession d'étapes suivantes :

- une minute à 65°C, une minute à 57°C, une minute à 52°C, une minute à 48°C, une minute à 43°C et dix minutes à 37°C.

25 50) Plante transgénique ayant intégré de manière stable dans son génome au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33 respectivement.

51) Plante transgénique selon la revendication 50, caractérisée 30 en ce qu'elle est choisie parmi les espèces dicotylédones, telles que la pomme de terre, le tabac, le coton, la laitue, la tomate, le melon, le concombre, le pois, le colza, la betterave, ou le tournesol, ou les espèces monocotylédones, telles que le blé, l'orge, l'avoine, le riz, ou le maïs.

35 52) Propagule d'une plante transgénique selon l'une quelconque des revendications 50 ou 51.

53) Propagule d'une plante transgénique selon la revendication 52, caractérisée en ce qu'elle est une semence.

54) Cellule contenant un promoteur ou une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33 respectivement.

55) Cellule selon la revendication 54, caractérisée en ce qu'elle est une cellule végétale.

56) Méthode d'expression d'une séquence d'acide nucléique, ou gène, codant pour un polypeptide à produire, dans une cellule, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes consistant à :

- transformer la cellule avec un vecteur comprenant au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33 ;

15 - faire une culture de la cellule dans des conditions permettant l'expression de la séquence d'acide nucléique, ou gène, codant pour le polypeptide.

57) Méthode selon la revendication 56, caractérisée en ce que la cellule est une cellule procaryote ou eucaryote.

20 58) Méthode selon l'une quelconque des revendications 56 ou 57, caractérisée en ce que la cellule est une cellule choisie dans le groupe consistant en les cellules microbiennes, les cellules fongiques, les cellules d'insectes, les cellules animales, et les cellules végétales.

25 59) Méthode selon l'une quelconque des revendications 56 à 58, caractérisée en ce que la cellule est une cellule végétale.

60) Méthode d'obtention d'une plante transgénique selon l'une quelconque des revendications 50 ou 51, ou d'une propagule selon la revendication 52, caractérisée en ce qu'elle comprend les 30 étapes consistant à :

- transformer une cellule végétale avec un vecteur comprenant au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33 ;

35 - sélectionner la cellule végétale ayant intégré le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice ;

- propager la cellule végétale transformée et sélectionnée, soit en culture, soit par régénération de plantes entières chimériques ou transgéniques.

## REVENDICATIONS

54

- 1) Promoteur chimérique d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un premier promoteur végétal comportant une région promotrice de l'expression vasculaire végétale, ladite région promotrice vasculaire végétale étant remplacée par une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un deuxième promoteur végétal et comportant une région promotrice de l'expression dans des tissus verts végétaux.
- 2) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit premier promoteur végétal provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV) et ledit deuxième promoteur végétal provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV).
- 3) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les séquences d'acide nucléique proviennent des régions intergéniques des premier et deuxième promoteurs.
- 4) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID01 fusionnée à au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID02.
- 5) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur chimérique consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID03.
- 6) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID04.
- 7) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID05.
- 35 8) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des

revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID06.

9) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des

5 revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID07.

10) Promoteur chimérique d'expression comprenant un promoteur d'origine virale, dont une partie consiste en un élément exogène 10 promoteur de l'expression dans des tissus végétaux verts (GT).

11) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'élément exogène promoteur GT est également d'origine virale.

12) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication

15 10, caractérisé en ce que le promoteur d'origine virale provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV).

13) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'élément exogène promoteur provient du virus de la mosaïque de cassava (CsVMV).

20 14) Promoteur chimérique d'expression selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'élément exogène GT remplace l'élément endogène promoteur de l'expression dans les tissus vasculaires (VT) du promoteur d'origine virale.

15) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des

25 revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une boîte "endosperme like".

16) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une boîte "asl like" liée de manière

30 opérationnelle en amont de l'élément promoteur dans les tissus végétaux verts GT.

17) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des

revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une boîte "asl" liée de manière opérationnelle en

35 amont de l'élément promoteur dans les tissus végétaux verts GT.

18) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une boîte "as2" liée de manière opérationnelle en amont de l'élément promoteur dans les tissus verts végétaux GT.

5 19) Promoteur chimérique selon l'une quelconque des revendications 10 à 18 précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence choisie parmi le groupe consistant en SEQ.ID02, SEQ.ID03, SEQ.ID04, SEQ.ID05, SEQ.ID06, et SEQ.ID07.

10 20) Cassette d'expression comprenant au moins une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un premier promoteur végétal comportant une région promotrice de l'expression vasculaire végétale, ladite région promotrice vasculaire végétale étant remplacée par une séquence d'acide nucléique, dérivée d'un

15 deuxième promoteur végétal et comportant une région promotrice de l'expression dans des tissus verts végétaux, les séquences étant liées de manière opérationnelle à une séquence d'acide nucléique à exprimer codant pour un polypeptide à produire, elle même liée à une séquence d'acide nucléique de terminaison de

20 transcription.

21) Cassette d'expression selon la revendication 20, caractérisée en ce que ledit premier promoteur végétal provient du virus de la mosaïque jaune de commelina (CoYMV) et ledit deuxième promoteur végétal provient du virus de la mosaïque de

25 cassava (CsVMV).

22) Cassette d'expression selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique identifiée sous le numéro SEQ.ID01 fusionnée à au moins une partie d'une séquence d'acide nucléique

30 identifiée sous le numéro SEQ.ID02.

23) Cassette d'expression selon la revendication 20, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID03.

35 24) Cassette d'expression selon la revendication 20,

caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID04.

25) Cassette d'expression selon la revendication 20,

5 caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID05.

26) Cassette d'expression selon la revendication 20,

caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du

10 promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID06.

27) Cassette d'expression selon la revendication 20,

caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique du

promoteur consiste en la séquence identifiée sous le numéro

15 SEQ.ID07.

28) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend une fusion d'au moins une partie de chacune des séquences identifiées sous les numéros SEQ.ID01 et SEQ.ID02.

20 29) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID03.

30) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la

25 séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID04.

31) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID05.

30 32) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID06.

33) Séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID07.

35 34) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur

chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID08.

5 35) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID09.

10 36) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID10.

15 37) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID11.

20 38) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID12.

25 39) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID13.

30 40) Motif désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID14.

35 41) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un

promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID15.

5 42) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID16.

10 43) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID17.

15 44) Motif de guidage désoxynucléotidique de construction d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence identifiée sous le numéro SEQ.ID18.

20 45) Vecteur comprenant un promoteur, ou une séquence d'acide nucléique promotrice, capable d'initier la transcription d'une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide à produire, caractérisé en ce que le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice isolé correspond à un promoteur

25 chimérique d'expression ou à une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33.

46) Vecteur selon la revendication 45, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe consistant en les vecteurs binaires

30 identifiés sous les numéros pMRT1152, pMRT1171, pMRT1172.

47) Procédé d'obtention d'un promoteur chimérique d'expression ou d'une séquence d'acide nucléique promotrice isolée selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

35 - effectuer une réaction de ligation en chaîne, appelée

LCR, produisant un ADN simple brin continu à partir d'au moins un motif désoxynucléotidique de construction choisi parmi le groupe consistant en les désoxynucléotides "sens" S1, S2, S3, S4, S5, S6, et S7 identifiés sous les numéros SEQ.ID08,

5 SEQ.ID09, SEQ.ID10, SEQ.ID11, SEQ.ID12, SEQ.ID13 et SEQ.ID14 respectivement, et au moins un motif de guidage désoxynucléotidique de construction de ladite séquence d'acide nucléique promotrice ou du promoteur choisi parmi le groupe consistant en les désoxynucléotides de guidage G1, G2, G3, et G4

10 identifiés sous les numéros SEQ.ID15, SEQ.ID16, SEQ.ID17 et SEQ.ID18 respectivement;

- effectuer une amplification PCR sur le simple brin obtenu dans l'étape précédente permettant d'obtenir un ADN double brin correspondant au promoteur chimérique d'expression ou à la

15 séquence d'acide nucléique promotrice;

- éventuellement isoler le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice.

48) Procédé selon la revendication 47, caractérisé en ce que l'on phosphoryle les motifs désoxynucléotidiques de construction

20 avant ligation.

49) Procédé selon la revendication 47, caractérisé en ce que la ligation s'effectue en présence d'au moins une ligase d'ADN dans un thermocycleur, selon les conditions suivantes :

- un cycle d'environ une minute à environ 94°C ;

25 - huit cycles identiques chacun composé de la succession d'étapes suivantes :

- une minute à 65°C, une minute à 57°C, une minute à 52°C, une minute à 48°C, une minute à 43°C et dix minutes à 37°C.

50) Plante transgénique ayant intégré de manière stable dans

30 son génome au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33 respectivement.

51) Plante transgénique selon la revendication 50, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les espèces dicotylédones,

35 telles que la pomme de terre, le tabac, le coton, la laitue, la

tomate, le melon, le concombre, le pois, le colza, la betterave, ou le tournesol, ou les espèces monocotylédones, telles que le blé, l'orge, l'avoine, le riz, ou le maïs.

52) Propagule d'une plante transgénique selon l'une quelconque des revendications 50 ou 51.

53) Propagule d'une plante transgénique selon la revendication 52, caractérisée en ce qu'elle est une semence.

54) Cellule contenant un promoteur ou une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 10 à 19 ou 28 à 33 respectivement.

55) Cellule selon la revendication 54, caractérisée en ce qu'elle est une cellule végétale.

56) Méthode d'expression d'une séquence d'acide nucléique, ou gène, codant pour un polypeptide à produire, dans une cellule, 15 caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes consistant à :

- transformer la cellule avec un vecteur comprenant au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33 ;

20 - faire une culture de la cellule dans des conditions permettant l'expression de la séquence d'acide nucléique, ou gène, codant pour le polypeptide.

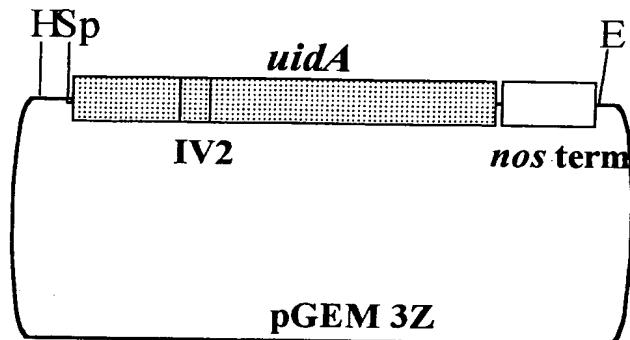
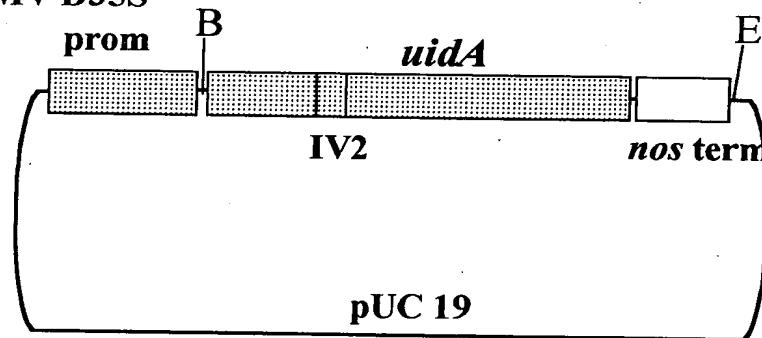
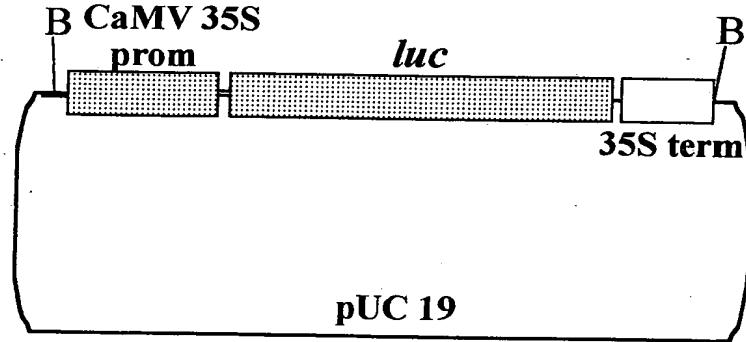
57) Méthode selon la revendication 56, caractérisée en ce que la cellule est une cellule procaryote ou eucaryote.

25 58) Méthode selon l'une quelconque des revendications 56 ou 57, caractérisée en ce que la cellule est une cellule choisie dans le groupe consistant en les cellules microbiennes, les cellules fongiques, les cellules d'insectes, les cellules animales, et les cellules végétales.

30 59) Méthode selon l'une quelconque des revendications 56 à 58, caractérisée en ce que la cellule est une cellule végétale.

60) Méthode d'obtention d'une plante transgénique selon l'une quelconque des revendications 50 ou 51, ou d'une propagule selon la revendication 52, caractérisée en ce qu'elle comprend les 35 étapes consistant à :

- transformer une cellule végétale avec un vecteur comprenant au moins un promoteur ou au moins une séquence d'acide nucléique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 ou 28 à 33 ;
- 5 - sélectionner la cellule végétale ayant intégré le promoteur ou la séquence d'acide nucléique promotrice ;
  - propager la cellule végétale transformée et sélectionnée, soit en culture, soit par régénération de plantes entières chimériques ou transgéniques.

**Fig. I****pMRT1144****Fig. II****CaMV D35S****pMRT1092****Fig. III****B CaMV 35S****pCaMV35S luc**

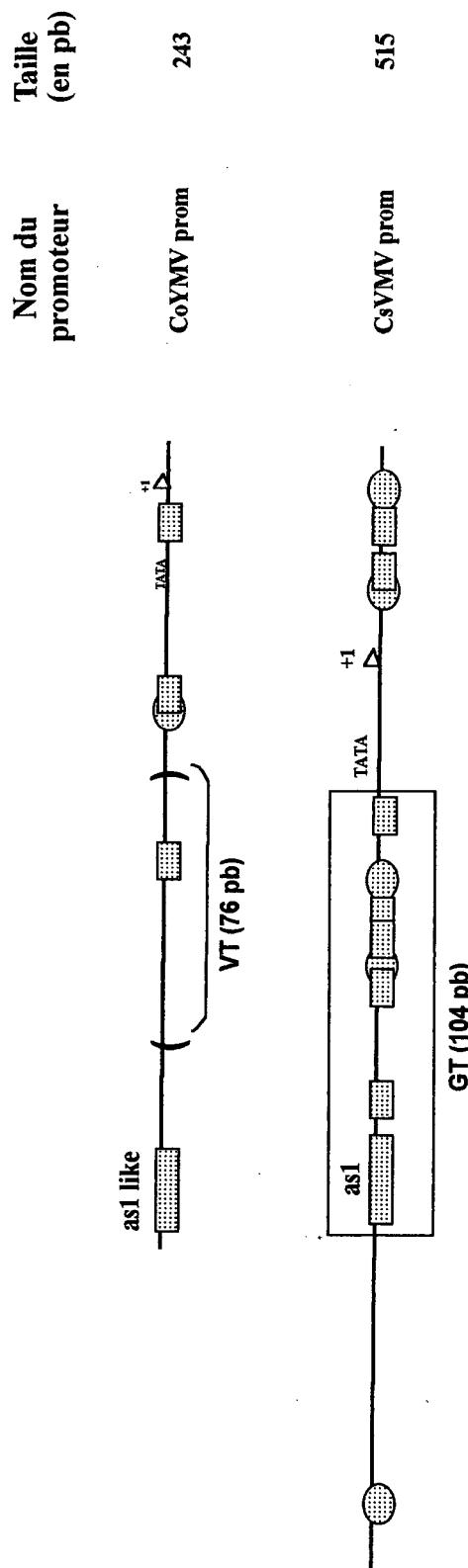
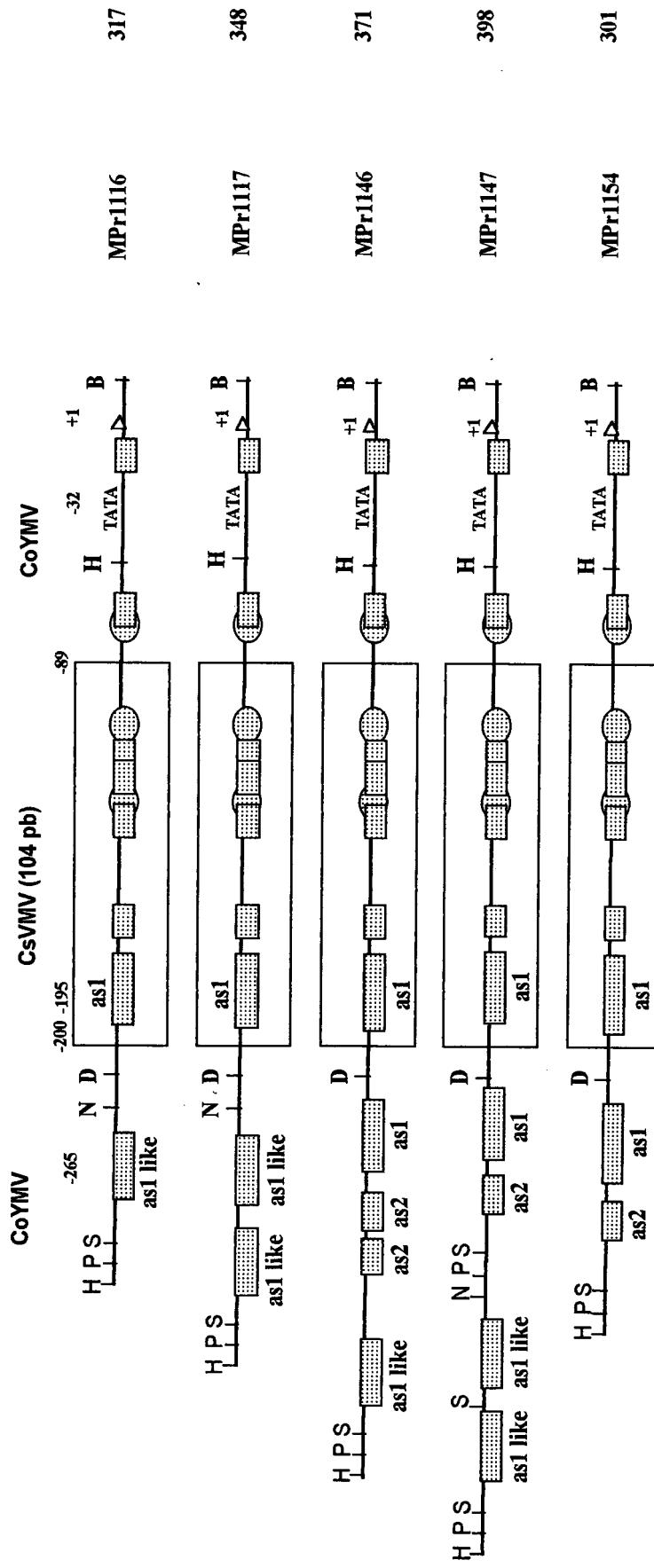
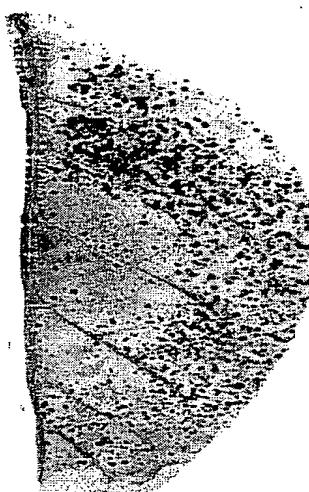


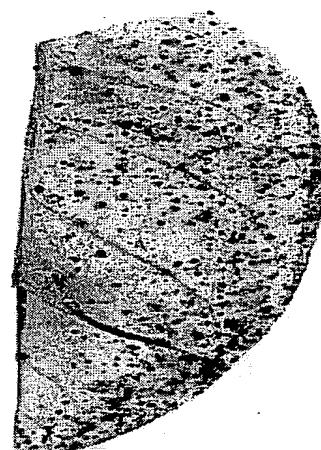
Fig. IV



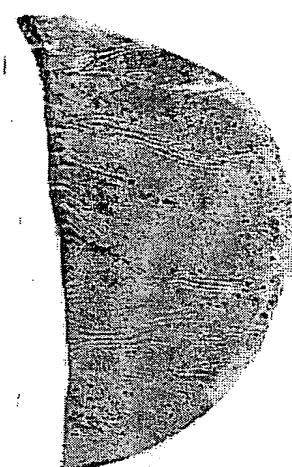
BEST AVAILABLE COPY



**pMRT1082**



**pMRT1116**



**pMRT1117**



**pMRT1146**



**pMRT1147**

Fig. VI

